

ĐẠI HỌC QUỐC GIA TP. HCM  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN

NGUYỄN THỊ THU TRANG

**NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH KHÁNG *Staphylococcus aureus*,  
KHÁNG OXY HÓA MỘT SỐ LOÀI NẤM THUỘC HỌ  
Ganodermataceae THU NHẬN TẠI TÂY NGUYÊN  
VÀ TP. HỒ CHÍ MINH**

Ngành: Vi sinh vật học

Mã số ngành: 9420107

**TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ**

TP. Hồ Chí Minh – Năm 2025

Công trình được hoàn thành tại: Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

Người hướng dẫn khoa học:

1. HDC: GS. TS. Trần Linh Thước
2. HDP: TS. Trần Mạnh Hùng

Phản biện 1: PGS.TS. Nguyễn Bảo Quốc

Phản biện 2: PGS.TS. Ngô Đại Hùng

Phản biện 3: PGS.TS. Lê Thị Thủy Tiên

Phản biện độc lập 1: miễn

Phản biện độc lập 2: miễn

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp cơ sở đào tạo họp tại Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, vào hồi ... giờ .... ngày .... tháng ... năm 2025

Có thể tìm hiểu luận án tại thư viện:

- Thư viện Khoa học Tổng hợp TP.HCM
- Thư viện Đại học Quốc gia TP.HCM
- Thư viện Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

## CHƯƠNG 1. MỞ ĐẦU

Họ nấm Ganodermataceae được phân bố ở khắp nơi trên thế giới, gồm nhiều loài được sử dụng làm dược liệu từ lâu đời, điển hình là nấm *Ganoderma lingzhi*, loài nấm dược liệu quý được sử dụng phổ biến từ xa xưa tại các nước Châu Á. Cho tới hiện tại, họ Ganodermataceae có khoảng 20 chi trong đó phổ biến nhất có hai chi có thành phần loài và phân bố phổ biến nhất là *Ganoderma* và *Amauroderma*. Tuy nhiên, việc phân loại họ nấm Ganodermataceae tại Việt Nam còn chủ yếu dựa vào hình thái học. Do vậy, sử dụng phương pháp sinh học phân tử kết hợp với phương pháp hình thái học để định danh chính xác tên loài nấm thuộc họ Ganodermataceae đang là vấn đề cấp thiết trong việc phân loại họ nấm có giá trị dược tính quan trọng này. Tây Nguyên là khu vực hiện có các Vườn quốc gia và khu bảo tồn thiên nhiên lớn của cả nước với những khu vực có điều kiện sinh trưởng phù hợp với sự phát triển của các loài nấm thuộc họ Ganodermataceae. Các công trình khoa học sau này đã chứng minh nấm thuộc chi *Ganoderma*, đặc biệt là loài *G. lucidum*, có ít nhất sáu tác dụng dược lý đáng chú ý trong đó có hoạt tính kháng khuẩn và hoạt tính kháng oxy hoá.

Cho tới hiện tại, các nghiên cứu đã chứng minh *in vitro* có khoảng 22 loài nấm thuộc họ Ganodermataceae có tác dụng kháng nhiều vi khuẩn Gram âm và Gram dương. Trong đó, tụ cầu khuẩn *Staphylococcus aureus* (SA) là vi khuẩn Gram dương kỵ khí tùy ý, là thành phần của hệ vi sinh vật tự nhiên trên nhiều vùng khác nhau ở cơ thể người, đồng thời là tác nhân hàng đầu gây bệnh nhiễm trùng qua da, các mô mềm, gây ra các tình trạng viêm nhiễm nghiêm trọng. Nghiên cứu hoạt tính kháng SA đã được thực hiện ở thực vật, vi nấm dựa vào sàng lọc *in vitro*, *in silico* hay phát triển ra sản phẩm cao chiết hay hợp chất trong thương mại. Đặc biệt, sàng lọc *in silico* liên quan tới tính kháng SA dựa trên các protein bề mặt (yếu tố kết tụ A, sortase A) và các protein tiết liên quan tới quá trình biến dưỡng (dihydrofolate reductase, phosphotransacetylase). Tuy nhiên, đối với nấm lớn, đặc biệt là họ Ganodermataceae mới dựa vào sàng lọc *in vitro* chưa có các nghiên cứu sàng lọc *in silico* trên các protein mục tiêu.

Ngoài hoạt tính kháng khuẩn nấm họ Ganodermataceae còn có các hoạt tính sinh học đáng chú ý khác trong đó có hoạt tính kháng oxy hóa. Các hợp chất kháng oxy hóa của nấm Ganodermataceae đã được nghiên cứu từ quả thể của nấm thu nhận trong từ tự nhiên. Đối với các loài nấm có thể nuôi trồng nhân tạo, ngoài quả thể, hệ sợi sinh dưỡng của nấm là nguồn nguyên liệu quan trọng để thu nhận cao chiết và hợp chất có hoạt tính kháng oxy hoá. Trong thể sợi nấm, thành phần chủ yếu là polysaccharide từ vách tế bào. Vì vậy, việc nghiên cứu và khai thác hệ sợi nấm của các loài thuộc họ Ganodermataceae có nguồn gốc tại Việt Nam không chỉ giúp chủ động trong sản xuất mà còn phù hợp với điều kiện địa phương, tạo tiền đề cho ứng dụng trong các lĩnh vực như thực phẩm bổ sung, hóa mỹ phẩm và dược phẩm.

Luận án “Nghiên cứu hoạt tính kháng *Staphylococcus aureus*, kháng oxy hóa một số loài nấm thuộc họ Ganodermataceae thu nhận tại Tây Nguyên và TP. Hồ Chí Minh” là công trình được thực hiện với mục tiêu nhằm đóng góp thêm vào sự hiểu biết về tính đa dạng của các loài nấm thuộc họ Ganodermataceae tại Việt Nam nói chung, tại Tây Nguyên và TP. Hồ Chí Minh nói riêng, về cơ sở khoa học của giá trị tài nguyên của các loài nấm này như là nguồn thu nhận cao chiết, hợp chất có hoạt tính sinh học có giá trị, đặc biệt là hoạt tính kháng SA và kháng oxy hóa.

## CHƯƠNG 2. TỔNG QUAN

### 2.1. Họ nấm Ganodermataceae

Họ nấm Ganodermataceae bao gồm các chi và loài nấm với đặc điểm quả thể là cơ quan sinh sản của nấm có cấu trúc bì dai (hóa gỗ), có thụ tầng dạng lỗ và bào tử đám có hai lớp vách, điển hình như nấm *Ganoderma lingzhi*. Đây là họ nấm được thu hái từ tự nhiên và được nuôi trồng làm dược liệu phổ biến nhất ở Châu Á trong nhóm các loài nấm dược liệu.

Ganodermataceae là họ nấm thuộc bộ nấm lỗ Polyporales, lớp nấm tán Agaricomycetes, ngành nấm đảm Basidiomycota. Theo dữ liệu nấm quốc tế tại Mycobank truy cập ngày 07 tháng 05 năm 2024 (<http://mycobank.org>), hiện tại họ Ganodermataceae có khoảng 20 chi. Trong đó hai chi *Ganoderma* và *Amauroderma* là hai chi phổ biến nhất trong họ Ganodermataceae. Mặc dù, nấm họ Ganodermataceae là những loài hóa gỗ, không được sử dụng làm thực phẩm, nhưng đối với con người, họ nấm này đã được sử dụng từ xa xưa với vai trò là nấm dược liệu ở một số nước trên thế giới. Hiện nay một số loài nấm Ganodermataceae được nuôi trồng nhân tạo, đa số là các loài nấm hoại sinh, phá gỗ mạnh nên được trồng bằng chất liệu gỗ không có tinh dầu. Ganodermataceae được trồng thành công trong môi trường nhân tạo tại Trung Quốc vào năm 1969, từ đó nấm được nuôi trồng rộng khắp các nước Châu Á khác, với các sản phẩm đa dạng nhất trong các loại nấm dược liệu đã mang lại doanh thu 2,5 tỷ đô la Mỹ mỗi năm. Tại Việt Nam, nấm linh chi đã được ghi nhận ngoài tự nhiên từ thế kỉ 18 trong sách thuốc của lương y Lê Hữu Trác. Một số loài nấm như *G. lucidum* được trồng trong điều kiện nhân tạo chỉ từ năm 1980 trở lại đây. Các công trình nghiên cứu về nuôi trồng, hoạt chất, dược tính của các loài Ganodermataceae được phổ biến tới người tiêu dùng nên nhu cầu sử dụng nấm thuộc họ này ngày càng gia tăng tại Việt Nam.

### 2.1. Vi khuẩn gây bệnh *Staphylococcus aureus* và tính kháng thuốc

*Staphylococcus aureus* là vi khuẩn Gram dương hình cầu đường kính 0,5 đến 1,5  $\mu\text{m}$ , các tế bào thường kết tụ với nhau tạo thành cụm tế bào như chùm nho (nên còn gọi là tụ cầu vàng). *S. aureus* có đặc điểm kỵ khí tùy ý, không di động, không tạo bào tử, catalase và coagulase dương tính, có khuẩn lạc màu vàng đặc trưng bởi sắc tố carotenoid staphyloxanthin. Thành phần vách tế bào gồm 50% là lớp peptidoglycan, 40% chứa hai loại teichoic acid: teichoic acid nằm trong vách tế bào và lipoteichoic acid nằm trong lớp lipid có vai trò quan trọng trong vận chuyển vật chất của tế bào. Các protein bên ngoài màng tế bào chất và nằm trong vách tế bào như yếu tố kết tụ (clumping factor), sortase A, protein A v.v., có vai trò là yếu tố độc lực của vi khuẩn này. *S. aureus* tạo màng nhày polysaccharide bên ngoài lớp peptidoglycan có vai trò trong sự tạo biofilm giúp bảo vệ vi khuẩn khỏi thực bào khi xâm nhiễm vào cơ thể vật chủ, gây nhiễm trùng máu, giúp vi khuẩn kháng lại một số kháng sinh cũng như các điều kiện khắc nghiệt của môi trường. *S. aureus* thường sống trên da và niêm mạc của động vật máu nóng. Vi khuẩn có khả năng lan nhiễm vào máu gây nhiễm trùng máu hay các ổ áp-xe tại các cơ quan nội tạng. Hiện nay, các chủng tụ cầu vàng có khả năng kháng nhiều loại kháng sinh khác nhau như nhóm  $\beta$ -lactam (penicillin, methicillin), glycopeptide (vancomycin) v.v.

Ngày nay, kháng sinh là liệu pháp hiệu quả để điều trị các bệnh nhiễm trùng phổ biến ở người. Tuy nhiên, việc lạm dụng kháng sinh trong sản xuất và đời sống là nguyên nhân chính làm xuất hiện các chủng gây bệnh kháng thuốc với tốc độ nhanh, tạo ra thách thức lớn cho con người trong việc tìm kiếm, phát triển các loại kháng sinh mới hiệu quả đối với các vi khuẩn gây bệnh kháng thuốc, đặc biệt là các chủng đa kháng. Hiện nay *S. aureus* gây bệnh dần dần thích nghi với các nhóm thuốc kháng sinh. Kết quả các nghiên cứu đã cho thấy đến thập niên 60 của thế kỷ 20 khoảng 80% các chủng *S. aureus* gây bệnh được phân lập từ mẫu bệnh tại các bệnh viện có tính kháng penicillin. Đặc biệt đầu thập niên 70 và 80 đã xác định đã xác định được 2 nhóm *S. aureus* kháng thuốc nguy hiểm là Nhóm kháng methicillin (methicillin - resistant *S. aureus*, MRSA) và Nhóm kháng vancomycin (vancomycin - resistant *S. aureus*, VRSA), sau này lan rộng trên toàn cầu.

Yếu tố độc lực của *S. aureus* có hai loại chính: (i) Nhóm 1 là các protein nằm trên bề mặt tế bào vi khuẩn, được gọi chung là surfacome, tham gia vào quá trình xâm nhiễm (invasion) giúp tế bào bám dính vào bề mặt của tế bào vật chủ, tạo khuẩn lạc, xâm nhập vào lớp tế bào da, tế bào niêm mạc; (ii) Nhóm 2 là các protein tiết, được gọi chung là secretome, tham gia vào quá trình lan nhiễm (infection) giúp cho vi khuẩn xâm chiếm và lây lan nhanh trong cơ thể vật chủ. Các yếu tố độc lực này được dùng làm protein đích trong khám phá các thuốc điều trị *S. aureus*. Gần đây một số yếu tố độc lực khác được quan tâm làm protein đích để sàng lọc, phát triển kháng sinh mới trong điều trị MRSA, VRSA như sortase A, yếu tố kết tụ A v.v., là các protein trên màng, vách tế bào, hoặc dihydrofolate

reductase, phosphotransacetylase v.v., là các enzyme biến dưỡng có liên quan đến khả năng gây bệnh của vi khuẩn này.

### 2.3. Nghiên cứu tương tác giữa hợp chất phân tử lượng nhỏ và protein đích *in silico*

Các dịch bệnh nghiêm trọng như các dịch cúm những năm 1800, 1900, đại dịch COVID-19 hay sự tiến hóa nhanh chóng của các chủng vi khuẩn gây bệnh đa kháng thuốc, cũng như các bệnh rối loạn chuyển hóa như tiểu đường, béo phì v.v., đã đặt ra thách thức lớn trong việc tìm kiếm, phát triển thuốc mới hiệu quả để bảo vệ sức khỏe cộng đồng. Việc phát triển thành công một loại thuốc mới là một quá trình tiêu tốn nhiều nguồn lực, thời gian và chi phí, có thể phải tiêu tốn đến 2,6 tỷ USD và mất khoảng 14 năm. Do vậy nhu cầu cần có cách tiếp cận hiệu quả hơn về thời gian, chi phí trong nghiên cứu khám phá thuốc trở nên cấp bách. Một giải pháp hiệu quả là ứng dụng các phương pháp tin sinh học để sàng lọc các hợp chất tiềm năng hay sàng lọc ảo *in silico* (virtual screening, VS) nhằm tìm kiếm các hợp chất triển vọng từ các cơ sở dữ liệu, các thư viện hợp chất có số lượng lớn và cấu trúc hóa học đa dạng. Trong sàng lọc ảo *in silico* có hai phương pháp chính được sử dụng:

Docking phân tử (molecular docking) là một quá trình mô phỏng tính toán nhằm dự đoán khả năng tương tác giữa hai cấu trúc để tạo ra một cấu trúc ổn định thường là ái lực gắn giữa một hợp chất phân tử lượng nhỏ hay phối tử (ligand) với một protein hay thụ thể (receptor), giữa hai protein với nhau hoặc giữa một đoạn DNA/RNA với protein. Hiện nay, do việc sàng lọc thuốc bằng thực nghiệm tiêu tốn quá nhiều thời gian, công sức và tốn kém, nên docking phân tử là phương pháp được sử dụng rộng rãi ở cách tiếp cận SBVS để dự đoán ái lực và hoạt tính của các nhóm dược chất tiềm năng đối với protein đích có liên quan đến một bệnh lý, bệnh truyền nhiễm hay dịch bệnh, từ đó dự đoán khả năng hoạt hóa hoặc ức chế một protein mục tiêu. Mặt khác, phương pháp này cũng giúp dự đoán được vùng hoạt tính hay vị trí hoạt động của protein, vị trí và cấu hình ưu thế của cơ chất khi tương tác với phân tử protein. Để thực hiện chính xác quá trình docking, cần có độ phân giải cao của cấu trúc tinh thể tia X, phổ NMR hoặc mô hình tương đồng cấu trúc. Tuy nhiên, protein mục tiêu được lấy từ cơ sở dữ liệu không có các mô tả về đặc tính sinh hóa liên quan đến cấu trúc của protein, dẫn đến khả năng làm tăng số lượng dương tính giả trong sàng lọc ảo. Do vậy cần quan tâm đến tính linh hoạt của cấu trúc protein để làm tăng cơ hội sàng lọc đúng cấu hình gắn giữa ligand và protein từ đó giảm số lượng dương tính giả.

Ngoài ra, trong phương pháp *in silico* còn sử dụng mô phỏng động lực học phân tử là phương pháp cho phép mô phỏng các đặc điểm về cấu trúc, động học và nhiệt động của hệ thống đang xem xét. Các hợp chất thường là các phân tử sinh học (chất tan) như protein, enzyme, hoặc tập hợp màng sinh học được ngâm trong dung môi nước (nước hoặc chất điện phân). Trong trường hợp protein và enzyme, cấu trúc protein được lấy từ Ngân hàng dữ liệu protein (Protein Data Bank, PDB) đóng vai trò khởi đầu cho mô phỏng ĐLHPT. Nếu không có sẵn cấu trúc, các nhà nghiên cứu dùng đến mô hình hóa (dự đoán) cấu trúc cho sẵn như mô hình tương đồng hoặc mô hình so sánh.

## CHƯƠNG 3. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 3.1. Thiết bị, dụng cụ và vật liệu

#### 3.1.1. Vật liệu

Các mẫu nấm thuộc họ Ganodermataceae thu nhận từ khu vực Tây Nguyên và TP. Hồ Chí Minh.

Chủng vi khuẩn tụ cầu vàng *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, được cung cấp bởi Viện Y Tế Công Cộng thành phố Hồ Chí Minh.

#### 3.1.2. Môi trường nuôi cấy

Môi trường: PDA (Potato Dextrose Agar), PDB (Potato Dextrose Broth), MHA (Mueller Hinton Agar), MHB (Mueller Hinton Broth) của Himedia, Ấn Độ.

#### 3.1.3. Hóa chất, dụng cụ và thiết bị

Hóa chất, thuốc thử, dụng cụ và thiết bị đạt tiêu chuẩn phân tích.

## 3.2. Phương pháp

### 3.2.1. Phương pháp định danh nấm

#### 3.2.1.1. Địa điểm, thời gian, phương pháp thu và phân lập mẫu

Họ Ganodermataceae sống tại các vùng có độ ẩm cao, mưa nhiều nên việc lấy mẫu chủ yếu được thực hiện vào mùa mưa từ tháng 5 đến tháng 11. Nấm tươi được bảo quản tại nhiệt độ thấp từ 10 đến 15°C bằng đá khô, sau đó được phân lập tại chỗ và vận chuyển về phòng thí nghiệm để sấy khô. Nấm được sấy khô ở 50°C, bảo quản trong túi Zip có khóa kéo và bỏ hạt silicagel. Các đặc điểm đại thể được ghi chú lại vị trí thu mẫu và hình ảnh kỹ thuật số bằng máy ảnh. Tiêu chuẩn màu sắc để so sánh của Kornerup và Wansher được sử dụng để chuẩn màu của mẫu nấm thu được. Địa điểm và thời gian thu mẫu tại Khu bảo tồn Ea Sô (ES), VQG Chư Yang Sin (CYS), VQG Kon Ka Kinh (KKK), VQG Bidoup-Núi Bà (BNB) và Củ Chi, Cần Giờ, và nội thành TP. Hồ Chí Minh (HCM). Khuẩn ty được phân lập từ quả thể tươi trên môi trường PDA, cấy chuyển và thuần khiết chủng giống. Các chủng giống sẽ được soi kính hiển vi và ghi nhận các đặc điểm hiển vi trước khi đem đi tách chiết DNA tổng. Hệ sợi nấm các chủng nấm được bảo quản trong glycerol 30% ở -80°C. Mẫu được ký hiệu từ quốc gia thu mẫu (Việt Nam-VN) đến tên viết tắt của địa điểm thu mẫu đến năm thu mẫu và cuối cùng thứ tự của mẫu khi thu.

#### 3.2.1.1. Phương pháp định danh

Các mẫu nấm được định danh dựa trên đặc điểm hình thái, sinh thái học và đặc điểm phát triển của hệ sợi nấm trên môi trường nuôi cấy dựa theo khóa phân loại của Donk (1908) trên dữ liệu nấm trên hai ngân hàng mycobank.org và indexfungorum.org.

Phương pháp định danh sinh học phân tử thực hiện thông qua các bước khuếch đại và giải trình tự ITS của vùng ITS (cặp môi ITS1F/ITS4). Sau đó, kết quả trình tự DNA được nhập và xử lý loại bỏ các nucleotide xấu bằng phần mềm BioEdit 7.2. Trình tự DNA cuối cùng được so sánh với các trình tự khác trên dữ liệu Ngân hàng gen GenBank của NCBI bằng cách sử dụng công cụ BLAST. Các trình tự sau khi được BLAST và ghi nhận thông tin độ tương đồng trình tự đạt yêu cầu được gửi đến ngân hàng gen NCBI để xin cấp mã truy cập (accession number – AC) trên GenBank.

Các trình tự nấm thu được và các trình tự trên dữ liệu tìm kiếm trên GenBank sẽ được thu nhận, sắp giống cột bằng phần mềm ClustalW và chỉnh sửa bằng phần mềm AliView. Loài *Perenniporia subtephropora* thuộc chi (*Perenniporia*) được chọn là nhóm ngoại (outgroup) cho cây phát sinh loài. Mô hình tiến hóa tối ưu cho cây phát sinh loài được phân tích bằng phần mềm jModelTest v2.1.10 dựa trên chuẩn thông tin Akaike (Akaike information criterion, AIC) nhỏ nhất. Cây phát sinh loài được vẽ bằng phương pháp khả năng tối đa (Maximum likelihood) với phân tích bộ lặp bootstrap 1000 lần sử dụng phần mềm MEGA X, mô phỏng lại và chỉnh sửa bằng phần mềm FigTree v1.4.4, với hiển thị độ tin cậy chỉ số phân tích bootstrap (%)  $\geq 50\%$ .

### 1.3.2. Phương pháp nghiên cứu hoạt tính kháng *S. aureus* của cao chiết nấm

#### 1.3.2.1. Phương pháp chuẩn bị cấu trúc ligand và các protein đích dùng cho sàng lọc *in silico*

Ligand được dùng để sàng lọc *in silico* là các hợp chất chuyển hóa thứ cấp từ họ nấm Ganodermataceae đã được đăng ký trên ngân hàng hợp chất (<http://phytochem.nal.usda.gov>). Cấu trúc 3D của các hợp chất này được lấy từ PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) và được vẽ lại trên phần mềm MarvinSketch (Chemaxon Ltd., Mỹ). Tổng cộng có 80 hợp chất từ họ nấm Ganodermataceae đã được tìm thấy trên ngân hàng được dùng làm ligand để sàng lọc khả năng gắn lên trung tâm hoạt động của 4 protein liên quan đến tính kháng thuốc của *S. aureus* là sortase A (SrtA), yếu tố kết tụ A (ClfA), dihydrofolate reductase (DHFR), phosphotransacetylase (Pta). Danh mục 80 hợp chất này được trình bày ở tất cả các hợp chất được chuyển sang định dạng pdbqt sử dụng phần mềm Open Babel.

Cấu trúc tinh thể của 4 protein đích là SrtA (PDB ID: 2MLM, độ phân giải: 1,64 Å), ClfA (PDB ID: 1N67, độ phân giải: 1,90 Å), DHFR (PDB ID: 2W9G, độ phân giải: 1,95 Å), Pta (PDB ID: 4E4R, độ phân giải: 1,44 Å), được thu nhận từ Trung tâm Hợp tác về Ngân hàng Dữ liệu protein tin sinh học cấu trúc (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank, <http://rcsb.org>). Các phân tử nước của protein được loại bỏ bởi phần mềm Discovery Studio. Đối với SrtA và DHFR thực hiện tách đồng kết tinh ra khỏi cấu trúc tinh thể và re-dock dựa vào tính toán độ lệch trung bình bình phương (RMSD) sử dụng phần mềm PyMOL (giá trị RMSD nhỏ hơn 2 Å). Các nguyên tử hydro phân cực được thêm và gắn trường lực Kollman vào protein nhờ phần mềm Autodock v.1.5.6. Cấu trúc protein được chuyển sang định dạng pdbqt để tạo thuận lợi cho quá trình mô phỏng phân tử.

#### 1.3.2.2. Phương pháp docking phân tử

Phần mềm AutoDock v.1.5.6. được sử dụng để tìm ra cấu hình gắn tốt nhất của mỗi ligand từ Ganodermataceae được thu nhận từ ngân hàng các hợp chất với một trong 4 protein đích (SrtA, ClfA, DHFR, Pta). Tiến hành docking bằng phần mềm Autodock v.1.5.6 với kích thước hộp tìm kiếm (grid box) bao phủ vị trí hoạt động của protein được chọn từ vùng tương tác của đồng kết tinh hoặc các hộp tìm kiếm được định vị để bao phủ các vị trí hoạt động của protein bằng máy chủ CASTp (Computed Atlas of Surface Topography of proteins). Điểm số docking, được đo bằng kcal/mol, thu được từ kết quả docking mỗi hợp chất với protein đích dựa trên ái lực gắn giữa ligand và protein. Điểm số docking càng nhỏ thì năng lượng để tạo thành liên kết càng thấp, ái lực liên kết càng cao. Sau đó, sự tương tác phân tử giữa protein và ligand được hiển thị bằng Discovery Studio Visualizer 2020. Các sơ đồ 3D và 2D được tạo ra để cung cấp sự trình bày toàn diện về các tương tác liên kết giữa protein và phối tử, về tương tác của chúng ở cấp độ cấu trúc.

#### 1.3.2.3. Định tính, định lượng các nhóm hợp chất hữu cơ chính trong cao chiết 70% ethanol

Các thành phần hợp chất hữu cơ chính trong cao chiết 70% ethanol được định tính để tìm ra dung môi phù hợp cho chiết phân đoạn cao bao gồm alkanoid, đường khử, flavonoid, tannin và phenol, terpenoid, triterpenoid, saponin, steroid. Từ đó định lượng các thành phần hợp chất chính hợp chất phenol, triterpenoid và polysaccharide.

#### 1.3.2.4. Cô lập và xác định cấu trúc các hợp chất từ quả thể nấm

Từ 15g cao GME thu được 15 phân đoạn (kí hiệu từ Fr.1 đến Fr.15) bằng cách sử dụng sắc ký cột silica gel (80 × 5 cm, kích thước hạt 63 – 200 μm) với dung môi rửa giải gradient của CHCl<sub>3</sub>-MeOH (tỷ lệ 30:1 đến 0:1). Cấu trúc các hợp chất cô lập được xác định căn cứ vào các dữ liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton (<sup>1</sup>H-NMR) tại tần số 100 MHz, carbon 13 (<sup>13</sup>C-NMR) tại tần số 400 MHz với dung môi phù hợp trên máy cộng hưởng từ hạt nhân Varian Unity Inova 400 MHz. Từ đó so sánh dữ liệu phổ thu được với các dữ liệu đã công bố. Cấu trúc hợp chất được vẽ trên phần mềm MarvinSketch (Chemaxon Ltd., Mỹ).

#### 1.3.2.5. Phương pháp khảo sát hoạt tính kháng *Staphylococcus aureus*

##### a) Phương pháp khuếch tán đĩa thạch

Hoạt tính kháng khuẩn của cao tổng và các cao phân đoạn từ quả thể nấm trong luận án này được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch Kirby – Bauer theo Reller cùng cs và CLSI. Chủng *S. aureus* ATCC 29213 được cấy ria trên môi trường MHA, ủ ở 35 ± 2°C trước khi làm thí nghiệm từ 18-24 giờ theo tiêu chuẩn của CLSI. Tạo huyền phù vi khuẩn 10<sup>6</sup> CFU/mL bằng cách chuyển sinh khối khuẩn lặn vào 9 mL nước muối sinh lí 0,85% sao cho độ đục McFarland 0,5 với với OD<sub>600</sub> đạt khoảng 0,1, pha loãng 2 lần để thu được 10<sup>6</sup> CFU/mL. Dùng tăm bông vô trùng trải đều huyền phù vi khuẩn lên bề mặt môi trường MHA trên hộp Petri. Đặt đĩa giấy (φ 5 mm) lên bề mặt môi trường đã được trải khuẩn gồm bốn đĩa giấy chứa cao chiết nấm (nồng độ 100 mg/mL) với hàm lượng cao chiết trên mỗi đĩa giấy lần lượt là 1, 2, 3, 4 mg. Một đĩa giấy được bổ sung 20 μL DMSO 5% làm đối chứng âm và một đĩa giấy được bổ sung 20 μL kháng sinh ciprofloxacin 0,25 mg/mL làm đối chứng dương. Để đĩa Petri vào tủ lạnh 4°C trong 4 giờ, sau đó ủ ở 35 ± 2°C trong 24 giờ. Đo vòng vô khuẩn ở từng đĩa. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

### b) Xác định MIC và MBC

Nồng độ ức chế tối thiểu MIC là nồng độ thấp nhất của dung dịch chất thử có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn sau 18-24 giờ nuôi cấy ở  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ , không nhìn thấy sự phát triển của vi khuẩn trong môi trường nuôi cấy. Resazurin được bổ sung vào môi trường để hỗ trợ việc phát hiện có hay không có sự sinh trưởng của vi khuẩn dựa vào nguyên tắc NADH được tạo ra khi vi khuẩn biến dưỡng sẽ khử resazurin (màu xanh nước biển) thành resofurin (màu hồng). Từ các giếng khảo sát MIC, dung dịch huyền phù được chuyển qua môi trường mới, sau đó được ủ trong 18-24 giờ nuôi cấy ở  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu MBC là nồng độ thấp nhất mà tại đó chất kháng khuẩn tiêu diệt vi khuẩn trong dung dịch khi được phát hiện bằng resazurin. Bước sóng kích thích huỳnh quang và bước sóng phát quang của resofurin tại 545 nm và 590 nm. Các vi đĩa được đo 2 bước sóng nói trên trước khi cho 20  $\mu\text{L}$  resazurin (0,01%, w/v) và sau khi ủ 30 phút tại nhiệt độ  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . Tại giếng mà giá trị bước sóng phát quang 590 nm không thay đổi hoặc âm đó là không có sự hiện diện của *S. aureus* ATCC 29213.

### 3.3.3. Phương pháp nghiên cứu đặc điểm và hoạt tính kháng oxy hóa của các phân đoạn giàu polysaccharide thể sợi nấm

Hệ sợi nấm được giữ giống trên môi trường PDA tại  $4^\circ\text{C}$ . Sinh khối nấm được cấy truyền qua đĩa chứa môi trường PDA. Sau khi sợi nấm mọc đầy kín đĩa Petri, dùng dao cấy vô trùng chuyển 1,0  $\text{cm}^2$  sinh khối vào bình Erlen chứa 100 mL PDB và nuôi cấy lắc 150 rpm trong 2 tuần ở nhiệt độ  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . 10% sinh khối lỏng được chuyển vào 250 mL PDB tiếp tục nuôi cấy trong 2 tuần, sau đó tiếp tục chuyển 10% qua 2.500 mL PDB và nuôi cấy trong 2 tuần. Sau 2 tuần, loại dịch nuôi cấy thông qua ly tâm 6.000 rpm ở  $20^\circ\text{C}$ . Sinh khối sợi nấm được rửa với nước cất vô trùng 3 lần, sau đó sấy khô trong tủ sấy đến trọng lượng không đổi, lưu trữ ở  $-20^\circ\text{C}$  đến khi sử dụng. Các dung môi lần lượt được sử dụng là nước nóng, NaOH 2%, acetone 15% để thu nhận được 7 phân đoạn từ ASF1 đến ASF-7. Sau đó, các phân đoạn sẽ được loại protein và khử màu bằng dung dịch  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Trọng lượng trung bình được xác định bằng phương pháp sắc ký lọc gel. Thành phần đường đơn được tạo dẫn xuất tiền cột 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) và phát hiện bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC với chất chuẩn là các đường đơn mannose, rhamnose, glucose, xylose, galactose, arabinose được sử dụng làm chất chuẩn. Ngoài ra, quang phổ FTIR còn được sử dụng để cho biết đặc điểm của polysaccharide thu nhận được. Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa theo phương pháp DPPH và ABTS.

### 3.2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Tất cả các thử nghiệm được tiến hành ba lần và kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn (SD) sử dụng Microsoft Excel. Để kiểm tra mức ý nghĩa, phân tích ANOVA một yếu tố và hậu kiểm theo Tukey post hoc được thực hiện so sánh các mẫu tương ứng trên phần mềm R. Kết quả được đánh giá là có ý nghĩa nếu giá trị  $p < 0,05$ .

## CHƯƠNG 4. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN




### 4.1. Định danh và ghi nhận đặc điểm các chủng nấm thu thập tại khu vực Tây Nguyên và thành phố Hồ Chí Minh

Các mẫu nấm được định danh dựa trên đặc điểm hình thái, sinh thái học và đặc điểm phát triển của hệ sợi nấm trên môi trường nuôi cấy dựa theo khóa phân loại của Donk (1908) cùng dữ liệu nấm trên hai ngân hàng mycobank.org và indexfungorum.org. Các kết quả phân tích cụ thể làm cơ sở để định danh dựa trên đặc điểm hình thái, sinh thái học và sinh học phân tử theo Bảng 4.1. Các kết quả trên cây phát sinh loài cho thấy rằng các chủng nấm thu nhận tại Việt Nam có mối quan hệ gần với các chủng thu nhận tại Trung Quốc, các nước Đông Nam Á và Hàn Quốc. Mặt khác, trên cây phát sinh loài cũng cho thấy rằng chi *Ganoderma* có mối quan hệ gần với chi *Amauroderma* hơn chi *Foraminispora*. Ngoài ra, chi *Sanguinoderma* cũng có mối quan hệ gần nhất với chi












*Amauroderma*. Ngoài ra, trên cây phát sinh loài cho thấy sự chia nhánh trong chi phụ của *Ganoderma*: (i) chi phụ *Ganoderma* subgenus *Ganoderma* (laccate) bao gồm các loài: *G. angustisporum*, *G. casuarinicola*, *G. destructans*, *G. ecuadorensis*, *G. enigmaticum*, *G. flexipes*, *G. lingzhi*, *G. lucidum* complex *sensu lato* (*G. leucocontextum*, *G. lucidum*, *G. tsugae*), *G. multiplicatum*, *G. multipileum*, *G. orbiforme*, *G. philippii*, *G. sessile*, *G. sichuanense*, *G. sinense*, *G. subangustisporum*, *G. tropicum*, *G. weberianum*, *G. wiioense*; (ii) chi phụ *Ganoderma* subgenus *Elfvingia* (non-laccate) bao gồm các loài: *G. australe*, *G. ellipsoideum*, *G. lobatum*, *G. guangxiense*, *G. pfeifferi*. Từ đó cho thấy rằng, đa số các chủng nấm thuộc chi *Ganoderma* thu được trong luận án này thuộc nhóm laccate (10/13 loài).

**Bảng 4.1.** Kết quả định danh và ghi chú của các chủng nấm thu nhận tại Tây Nguyên và Thành phố Hồ Chí Minh

Số TT	Ký hiệu chủng	Nơi thu thập	Kết quả định danh		Ghi chú
			Dựa vào hình thái	Dựa vào trình tự ITS	
1	VNCYS 1805 	VQG Chư Yang Sin, tỉnh Đắc Lắc	<i>Ganoderma orbiforme</i> (Fr.) Ryvarden, Mycologia 92 (1): 187 (2000)	<i>Ganoderma orbiforme</i>	- Lần đầu tiên ghi nhận sự hiện diện tại VQG Chư Yang Sin, tỉnh Đắc Lắc, là khu vực rừng cây lá rộng có khí hậu nhiệt đới. - Trình tự vùng ITS mẫu nấm từ Việt Nam lần đầu tiên được đăng ký lên GenBank. (PP762492)*
2	VNES1801 	KBT Ea Sô, tỉnh Đắc Lắc	<i>Ganoderma tropicum</i> (Jungh.) Bres., Annales Mycologici 8 (6): 586 (1910)	<i>Ganoderma tropicum</i>	- Lần đầu tiên ghi nhận sự hiện diện tại KBT Ea Sô, tỉnh Đắc Lắc - Trình tự vùng ITS mẫu nấm từ Việt Nam lần đầu tiên được đăng ký lên GenBank. (PP767475)*
3	VNKKK1901 	VQG Kon Ka Kinh, tỉnh Gia Lai	<i>Ganoderma multiplicatum</i> (Mont.) Pat., Bulletin de la Société Mycologique de France 5: 74 (1889)	<i>Ganoderma multiplicatum</i>	- Trình tự vùng ITS mẫu nấm từ Việt Nam lần đầu tiên được đăng ký lên GenBank. (MZ703635)*

4	VNKKK1902 	VQG Kon Ka Kinh, tỉnh Gia Lai	<i>Ganoderma sinense</i> J.D. Zhao, L.W. Hsu & X.Q. Zhang, Acta Microbiol. Sin. 19(3):272 (1979).	<i>Ganoderma sinense</i>	- Trình tự vùng ITS mẫu nấm từ Việt Nam lần đầu tiên được đăng ký lên GenBank. (MZ706470)*
5	VNKKK1903 	VQG Kon Ka Kinh, tỉnh Gia Lai	<i>Ganoderma lingzhi</i> S.H. Wu, Y. Cao & Y.C. Dai, Fungal Diversity 56 (1): 54 (2012)	<i>Ganoderma lingzhi</i>	- Lần đầu tiên ghi nhận tại Việt Nam; mọc tại gốc cây gỗ cứng đã chết. - Trình tự vùng ITS mẫu nấm từ Việt Nam lần đầu tiên được đăng ký lên GenBank. (MZ706471)*
6	VNKKK1904 	VQG Kon Ka Kinh, tỉnh Gia Lai	<i>Amauroderma subresinosum</i> (Murrill) Corner, Beih. Nova Hedwigia 75:93 (1983)	<i>Amauroderma subresinosum</i>	- Lần đầu tiên tại Việt Nam ghi nhận sự hiện diện ở độ cao 900 - 1000 m so với mực nước biển - Trình tự vùng ITS mẫu nấm từ Việt Nam lần đầu tiên được đăng ký lên GenBank. (MZ706942)*.
7	VNKKK  1905A2	VQG Kon Ka Kinh, tỉnh Gia Lai	<i>Ganoderma lingzhi</i> S.H. Wu, Y. Cao & Y.C. Dai, Fungal Diversity 56 (1): 54 (2012)	<i>Ganoderma lingzhi</i>	- Mọc hoại sinh trên tầng thảm mục lá cây rừng nhiệt đới. - Trình tự vùng ITS mẫu nấm từ Việt Nam lần đầu tiên được đăng ký lên GenBank. (MZ706476)*
8	VNES22015-  A1	KBT Ea Sô, tỉnh Đắk Lắk	<i>Ganoderma ellipsoideum</i> Hapuar., T.C. Wen & K.D. Hyde, Mycosphere 9 (5): 951 (2018)	<i>Ganoderma ellipsoideum</i>	- Lần đầu tiên được ghi nhận tại Việt Nam. - Trình tự vùng ITS mẫu nấm từ Việt Nam lần đầu tiên được đăng ký lên GenBank. (OQ780769)*

9	VNES2204 	KBT Ea Sô, tỉnh Đắk Lắk	<i>Ganoderma weberianum</i> (Bres. & Henn. ex Sacc.) Steyaert, Persoonia 7(1): 79 (1972)	<i>Ganoderma weberianum</i>	- Lần đầu tiên ghi nhận sự hiện diện trên cây gỗ hai lá mầm hoại sinh tại Việt Nam - Trình tự vùng ITS mẫu nấm từ Việt Nam lần đầu tiên được đăng ký lên GenBank (PP763260)*
10	VNBNB2202 	VQG Bidoup, Núi Bà, tỉnh Lâm Đồng	<i>Ganoderma guangxiense</i> B. K. Cui, J.H. Xing & Y.F. Sun, 2022	<i>Ganoderma guangxiense</i>	- Lần đầu tiên ghi nhận tại Việt Nam. - Trình tự vùng ITS mẫu nấm từ Việt Nam lần đầu tiên được đăng ký lên GenBank. (PP762491)*
11	VNBNB2203 	VQG Bidoup, Núi Bà, tỉnh Lâm Đồng	<i>Sanguinoderma rugosum</i> (Blume & T. Nees) Y.F. Sun, D.H. Costa & B.K. Cui. 2020	<i>Sanguinoderma rugosum</i>	- - Lần đầu tiên ghi nhận tại Việt Nam. - Trình tự vùng ITS mẫu nấm từ Việt Nam lần đầu tiên được đăng ký lên GenBank. (PP763269)*
12	VNBNB2307 	VQG Bidoup, Núi Bà, tỉnh Lâm Đồng	<i>Foraminispora austrosinensis</i> (J .D. Zhao & L.W. Hsu) Y.F. Sun & B.K. Cui, in Sun, Costa-Rezende, Xing, Zhou, Zhang, Gibertoni, Gates, Glen, Dai & Cui 2020	<i>Foraminispora austrosinensis</i>	- Lần đầu tiên ghi nhận tại Việt Nam. - Trình tự vùng ITS mẫu nấm từ Việt Nam lần đầu tiên được đăng ký lên GenBank. (PP762085)*
13	VNBNB2310 	VQG Bidoup, Núi Bà, tỉnh Lâm Đồng	<i>Ganoderma subangustisporum</i> B.K. Cui, J.H. Xing & Y.F. Sun, Studies in Mycology 101: 346 (2022)	<i>Ganoderma subangustisporum</i>	- Lần đầu tiên ghi nhận tại Việt Nam. - Trình tự vùng ITS mẫu nấm từ Việt Nam lần đầu tiên được đăng ký lên GenBank. PP762534)*

14	VNHCM1805 	TP. HCM	<i>Ganoderma multipileum</i> Dinh Hou 1950	<i>Ganoderma multipileum</i>	- Lần đầu tiên trên thế giới ghi nhận sự ký sinh, gây chết cây phượng vĩ <i>Delonix regia</i> . - Trình tự vùng ITS mẫu nấm từ Việt Nam lần đầu tiên được đăng ký lên GenBank. (MZ706463)*
15	VNHCM1901 	TP. HCM	<i>Ganoderma australe</i> (Fr.) Pat., Bull. Soc. Mycol. Fr. 5(2,3):65 (1889)	<i>Ganoderma australe</i>	- Lần đầu tiên trên thế giới, ghi nhận sự hiện diện trên cây chủ một lá mầm ( <i>Dừa Cocos</i> sp.) - Trình tự vùng ITS mẫu nấm từ Việt Nam lần đầu tiên được đăng ký lên GenBank. (MZ706468)*
16	VNHCM1902 	TP. HCM	<i>Ganoderma sichuanense</i> J.D. Zhao & XQ. Zhang, Acta Mycol. Sin.:159 (1983)	<i>Ganoderma sichuanense</i>	- Trình tự vùng ITS mẫu nấm từ Việt Nam lần đầu tiên được đăng ký lên GenBank. (MZ706465)*
17	VNHCM2101 	TP. HCM	<i>Ganoderma casuarinicola</i> J.H. Xing, B.K. Cui & Y.C. Dai, MycoKeys 34: 100 (2018)	<i>Ganoderma casuarinicola</i>	- Lần đầu tiên ghi nhận tại Việt Nam. - Trình tự vùng ITS mẫu nấm từ Việt Nam lần đầu tiên được đăng ký lên GenBank. (PP762487)*

VQG: Vườn quốc gia; KBT: Khu bảo tồn thiên nhiên; TP.HCM: Thành phố Hồ Chí Minh; \* Vị trí locus trên GenBank.

#### 4.2. Nghiên cứu hoạt tính kháng *S. aureus* của cao chiết từ quả thể một số mẫu nấm thu thập được và đề xuất cơ chế kháng của hợp chất cô lập từ loài *G. multiplicatum*

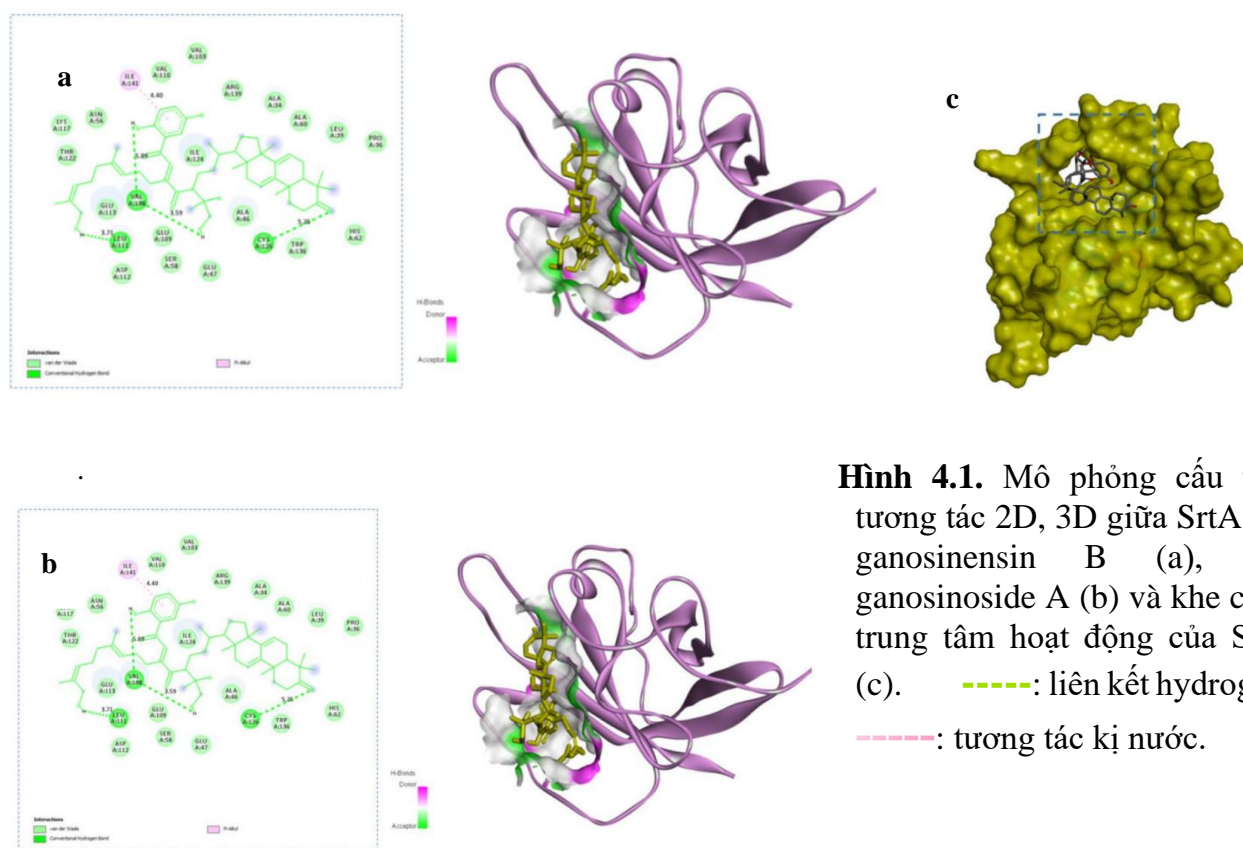
##### 4.2.1. Sàng lọc bằng phương pháp docking phân tử các hợp chất kháng *S. aureus* từ họ *Ganodermataceae*

###### 4.2.1.1. Trường hợp sortase A

Trong 80 hợp chất thu nhận từ ngân hàng hợp chất của họ nấm Ganodermataceae gần như đa số đều có điểm số docking lớn hơn đối chứng ciprofloxacin với 62 hợp chất, 5 hợp chất có điểm số docking tốt nhất (năng lượng gắn giữa hợp chất và SrtA) dao động trong khoảng từ -8,4 đến -8,0 kcal/mol (Bảng 4.2 và Hình 4.1).

**Bảng 4.2.** Các hợp chất có điểm số docking gắn với sortase A tốt nhất và đặc điểm liên kết

STT	Hợp chất	Điểm số docking (kcal/mol)	Liên kết hydrogen	Tương tác kỵ nước
1	Ganosinensin B	-8,4	Cys126, Val108, Leu111	Ile141
2	Ganosinoside A	-8,4	Glu113, Val108	Ile124, Trp136
3	Ganoderenic acid D	-8,1	Leu111, Cys126	
4	Jacareubin	-8,1	Asn56, Lys117	Glu113, Glu47
5	Ganodermanontriol	-8,0	Glu113, Leu111	Trp136



**Hình 4.1.** Mô phỏng cấu trúc tương tác 2D, 3D giữa SrtA với ganosinensin B (a), với ganosinoside A (b) và khe chứa trung tâm hoạt động của SrtA (c).  
 -----: liên kết hydrogen;  
 -----: tương tác kỵ nước.

#### 4.2.1.2. Trường hợp ClfA

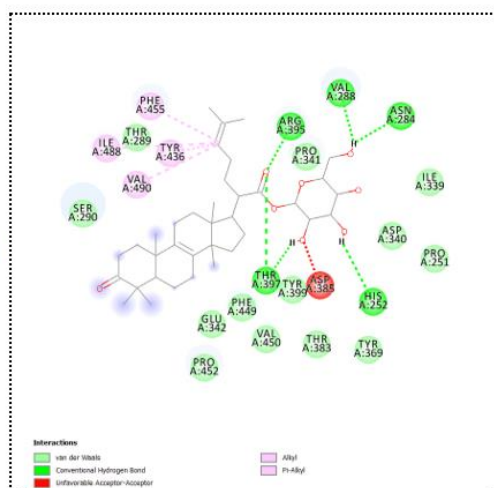
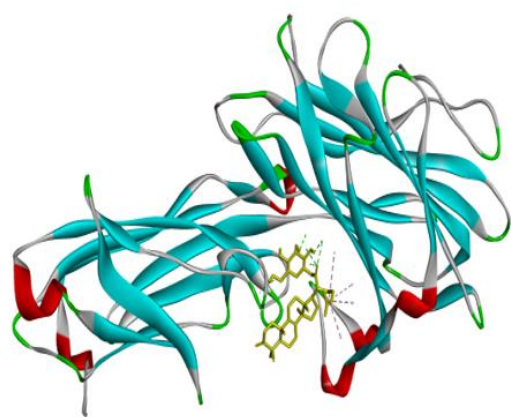
Qua sàng lọc có 47 hợp chất có điểm số docking nhỏ hơn -8,1 kcal/mol, là điểm số docking của ciprofloxacin, trong số này 6 hợp chất có điểm số docking tốt nhất được trình bày ở Bảng 4.3. Ganosinoside A và ganoderic acid AM1 có năng lượng tự do gắn thấp nhất với ClfA là -10,4. Ganosinoside A tạo liên kết hydrogen với ClfA tại 5 amino acid Arg395, Val288, Asn284, His252, và Thr397; tạo tương tác kỵ nước với ClfA tại 5 amino acid Phe455, Ile488, Al490, Tyr436 và Asp385 (Hình 3.21). Ganoderic acid AM1 tạo liên kết hydrogen với 5 amino acid Ile339, Pro251, Thr397, Arg395, và Pro341; tương tác kỵ nước tại Tyr436, Phe455, Pro452. Ganoderic acid J tạo tương tác kỵ nước tại Pro251. Ergosterol peroxide tạo một cầu nối hydrogen tại Thr397, tương tác kỵ nước tại Tyr436, Ile448,



Pro341, Val288, Val490 và Lys343. Ganoderic acid D tạo liên kết hydrogen với 3 amino acid tại Ile339, Tyr399 và Arg395. Trong khi đó, 24R-ergosta-7,2E-diene-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol tạo liên kết hydrogen tại Thr397 và tương tác kỵ nước với 4 amino acid Tyr436, Ile448, Lys434, Al490.

**Bảng 4.3.** Các hợp chất có điểm số docking với yếu tố kết tụ A tốt nhất và đặc điểm liên kết

STT	Hợp chất	Điểm số docking (kcal/mol)	Liên kết hydrogen	Tương tác kỵ nước
1	Ganosinose A	- 10,4	Arg395, Val288, Asn284, His252, Thr397	Phe455, Ile488, Al490, Tyr436, Asp385
2	Ganoderic acid AM1	- 10,4	Ile339, Pro251, Thr397, Arg395, Pro341	Tyr436, Phe455, Pro452
3	Ganoderic acid J	- 10,3		Pro251
4	Ergosterol peroxide	- 10,2	Thr397	Tyr436, Ile448, Pro341, Val288, Val490, Lys343
5	Ganoderic acid D	- 10,2	Ile339, Tyr399, Arg395	
6	24R-ergosta-7,2E-diene-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol	- 10,1	Thr397	Tyr436, Ile488, Lys434, Al490



**Hình 4.2.** Mô phỏng cấu trúc tương tác 2D, 3D giữa ganosinose A với ClfA. -----: liên kết hydrogen; -----: tương tác kỵ nước.

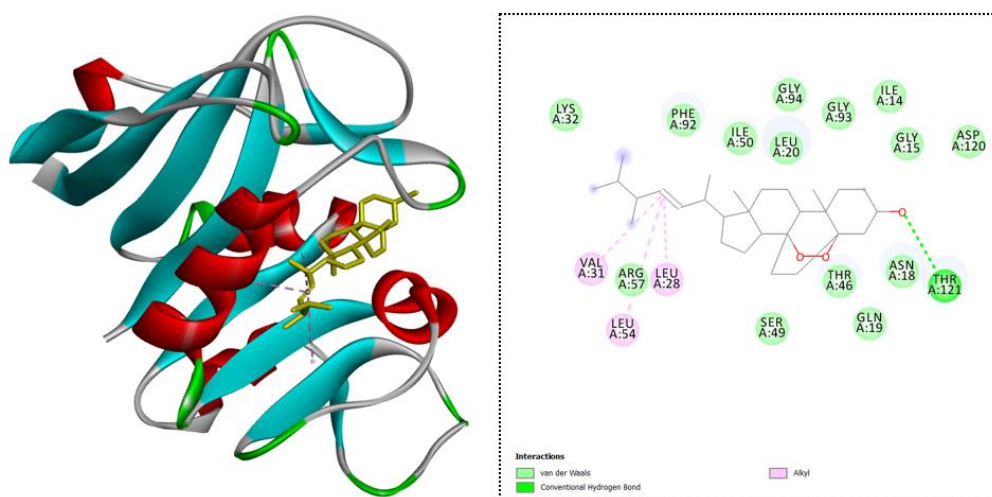
#### 4.2.1.3. Trường hợp dihydrofolate reductase

Trong 80 hợp chất được sàng lọc thì có 4 hợp chất có điểm số docking thấp hơn -9,5 kcal/mol là điểm số docking của ciprofloxacin. Ergosterol peroxide, ergosterol và 7-oxoganoderic acid Z có năng lượng tự do gắn là -10,2 kcal/mol (Bảng 4.4). Ergosterol peroxide gắn với dihydrofolate reductase thông qua liên kết hydrogen tại Thr121 và tương tác kỵ nước với 3 amino acid Val31, Leu28 và Leu54 (Hình 4.3). Ergosterol tạo 1 liên kết hydrogen tại

Asn18 và có tương tác kỵ nước với 5 amino acid là Ile50, Ile14, Val31, Leu28 và Phe92. 7-oxoganoderic acid Z gắn với dihydrofolate reductase thông qua liên kết hydrogen tại Thr46 và Thr96, tương tác kỵ nước với Thr46 và Phe92. Ganosinensin B tạo liên kết hydrogen với 6 amino acid là Ala7, Gly93, Thr46, Asn18, Pro21 Gln19, tương tương tác kỵ nước tại Leu20, Ile50, và Leu28.

**Bảng 4.4.** Các hợp chất có điểm số docking với dihydrofolate reductase tốt nhất và đặc điểm liên kết

STT	Hợp chất	Điểm số docking (kcal/mol)	Liên kết hydrogen	Tương tác kỵ nước
1	Ergosterol peroxide	- 10,2	Thr121	Val31, Leu28, Leu54
2	Ergosterol	- 10,2	Asn18	Ile50, Ile14, Val31, Leu28, Phe92
3	7- oxoganoderic acid Z	- 10,2	Thr46, Thr96	Thr46, Phe92
4	Ganosinensin B	- 10,0	Ala7, Gly93, Thr46, Asn18, Pro21, Gln19	Leu20, Ile50, Leu28



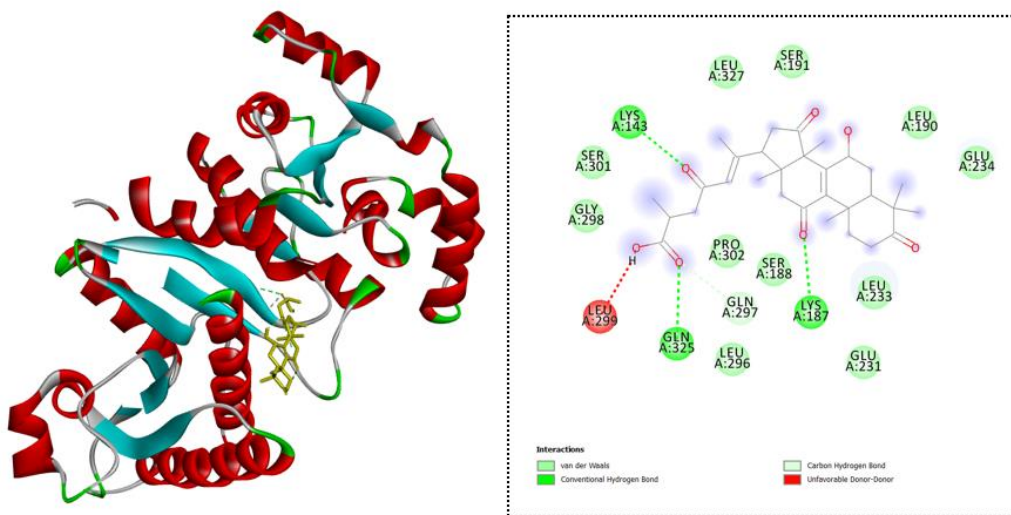
**Hình 4.3.** Mô phỏng cấu trúc tương tác 2D, 3D giữa ergosterol peroxide với dihydrofolate reductase. -----: liên kết hydrogen; -----: tương tác kỵ nước.

#### 4.1.1.4. Trường hợp phosphotransacetylase

Kết quả sàng lọc cho thấy 40 hợp chất có điểm số docking thấp hơn -7,1 kcal/mol, là điểm số docking của ciprofloxacin, trong đó 05 hợp chất có điểm số tốt nhất được trình bày trên Bảng 4.5. Ganolucidic acid B có điểm số docking tốt nhất là -8,9 kcal/mol, tạo liên kết hydrogen với Leu299, Lys143, Lys187, Gln325, Gln297, tương tác kỵ nước tại Leu299 (Hình 4.4). Ganoderenic acid D tạo liên kết hydrogen Gln325, Lys143, Lys187, tương tác kỵ nước với Leu299. Ganoderic acid AM1 tạo liên kết hydrogen với Ser191, Lys143, Gln325, Gly298, Leu299, Lys187, Gln297 nhưng không tạo tương tác kỵ nước. 1-Methoxy-2-(2-methoxyethenyl)-benzene tạo liên kết hydrogen với Ser191, Gln325, Lys232, Glu231, tương tác kỵ nước với Leu299, Gly298. Jacareubin tạo liên kết hydrogen với Gln325, Lys143, Lys187, tương tác kỵ nước Leu299.

**Bảng 4.5.** Các hợp chất có điểm số docking với phosphotransacetylase tốt nhất và đặc điểm liên kết

STT	Hợp chất	Điểm số docking (kcal/mol)	Liên kết hydrogen	Tương tác kỵ nước
1	Ganolucidic acid B	-8,9	Leu299, Lys143, Lys187, Gln325, Gln297	Leu299
2	Ganoderenic acid D	-8,7	Gln325, Lys143, Lys187	Leu299
3	Ganoderic acid AM1	-8,6	Ser191, Lys143, Gln325, Gly298, Leu299, Lys187, Gln297	
4	1-methoxy-2-(2-methoxyethyl)-benzene	-8,3	Ser191, Gln325, Lys232, Glu231	Leu299, Gly298
5	Jacareubin	-8,3	Gln325, Lys143, Lys187	Leu299



**Hình 4.4.** Mô phỏng cấu trúc tương tác 2D, 3D giữa ganolucidic acid B với phosphotransacetylase. -----: liên kết hydrogen; -----: tương tác kỵ nước.

#### 4.2.2. Đánh giá tính ổn định của các phức hợp ligand-protein đích bằng mô phỏng động lực học phân tử

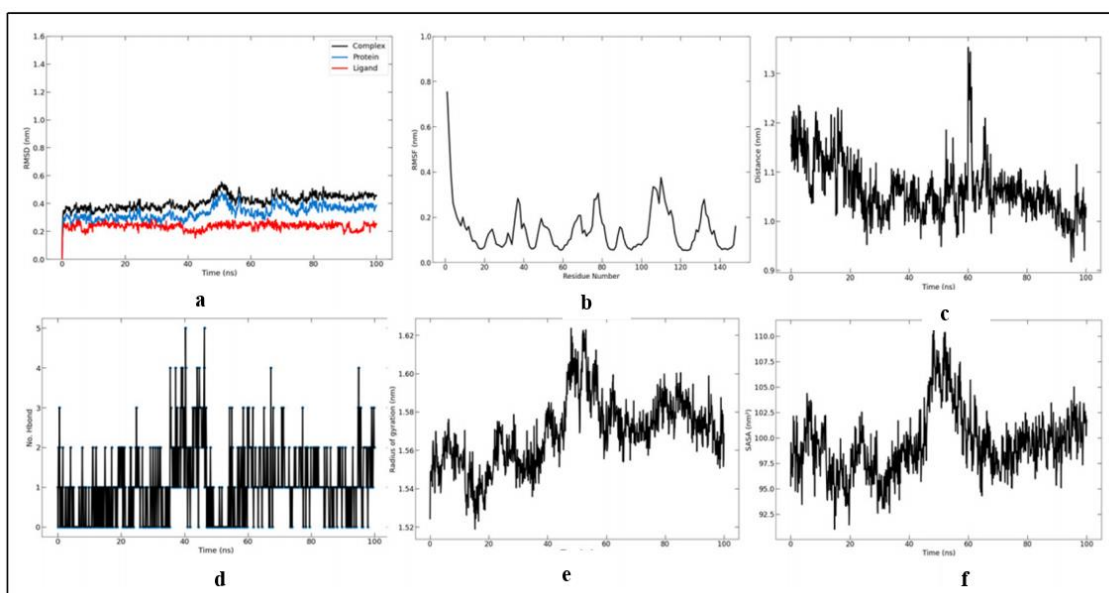
Phương pháp mô phỏng động lực học phân tử (ĐLHPT) được sử dụng để đánh giá tính ổn định ở các điều kiện nhiệt độ và áp suất trong điều kiện cân bằng của các phức hợp SrtA-ganosinensin B, SrtA-ganosinose A và ClfA-ganosinose A. Ưu điểm của phương pháp mô phỏng ĐLHPT là khả năng phát hiện tính linh hoạt của phức hợp protein-ligand, cho phép đánh giá chính xác nhiệt động lực học và động học xảy ra trong quá trình gắn giữa ligand và protein mục tiêu. Giá trị độ lệch trung bình bình phương RMSD (*root mean square deviation*) được dùng để phân tích các dao động của amino acid trên protein (protein-residue based fluctuation). Giá trị SASA (solvent accessible surface area, diện tích bề mặt tiếp xúc với dung môi) biểu thị diện tích bề mặt của protein tương tác với các phân tử dung môi (Hình 4.5f và Hình 4.5f). Trường hợp phức hợp SrtA-ganosinensin B, kết quả cho thấy cấu trúc phức hợp vẫn ổn định trong suốt thời gian mô phỏng, với sự dao động trong phạm vi 4 Å (Hình 4.5a). Giá trị RMSF (*root mean square fluctuation*, dao động trung bình bình phương góc) cũng cho thấy ganosinensin B làm ổn định một vài amino acid tương tác tại trung tâm hoạt động của SrtA (Hình 4.5b). Nhìn chung, cường độ dao động vẫn dưới 2,5 Å. Khoảng



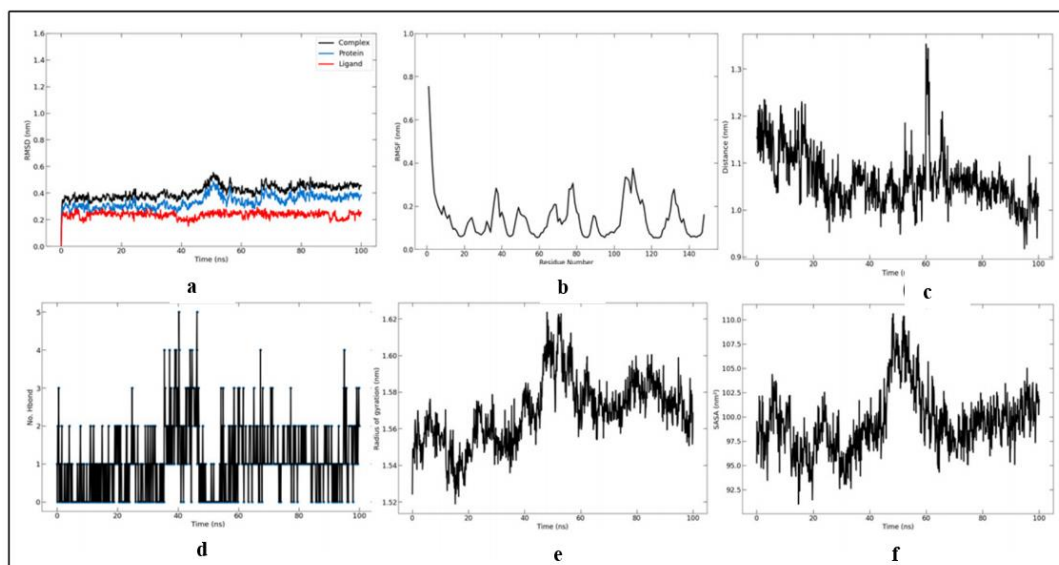
cách trung tâm khối lượng (center of mass distance) giữa ganosinensin B và SrtA trong thời gian mô phỏng được thể hiện trong Hình 4.24c. Kết quả cho thấy các phối tử dao động với khoảng cách ổn định < 5 Å. Ngoài ra, tổng số liên kết hydrogen được hình thành giữa ganosinensin B và SrtA trong 100 ns cũng được tính toán. Trong quỹ đạo động lực học phân tử, ganosinensin B hầu như luôn hình thành ít nhất 1 đến 2 liên kết hydrogen với SrtA (Hình 4.5d). Dao động của bán kính quay ( $R_g$ , sự phân bố các nguyên tử của protein xung quanh trục của mình) cho thấy ganosinensin B thay đổi cấu hình bên trong túi tương tác trong thời gian 80 ns. Điều này cho thấy có những dao động nhỏ về RMSD trong cùng thời gian.

Kết quả mô phỏng ĐLHPT của SrtA-ganosinoside A cho thấy phức hợp này vẫn ổn định trong suốt quá trình mô phỏng (Hình 4.6a). Kết quả RMSF cũng chứng minh rằng ganosinoside A làm ổn định vài amino acid tương tác tại trung tâm hoạt động của StrA (Hình 4.6b). Nhìn chung, cường độ dao động vẫn dưới 2,5 Å. Khoảng cách trung tâm khối lượng giữa ganosinoside A và SrtA trong thời gian mô phỏng được hiển thị trong Hình 4.6c. Kết quả cho thấy ganosinoside A có khoảng cách ổn định.

Kết quả tính toán tổng số liên kết hydrogen hình thành giữa ganosinoside A và SrtA trong 100 ns cho thấy ganosinoside A hầu như luôn hình thành ít nhất 1 liên kết hydrogen với SrtA (Hình 4.6d). Có sự thay đổi về  $R_g$  khi ganosinoside A gắn với SrtA, làm thay đổi cấu hình của ganosinoside A từ 40 đến 60 ns.



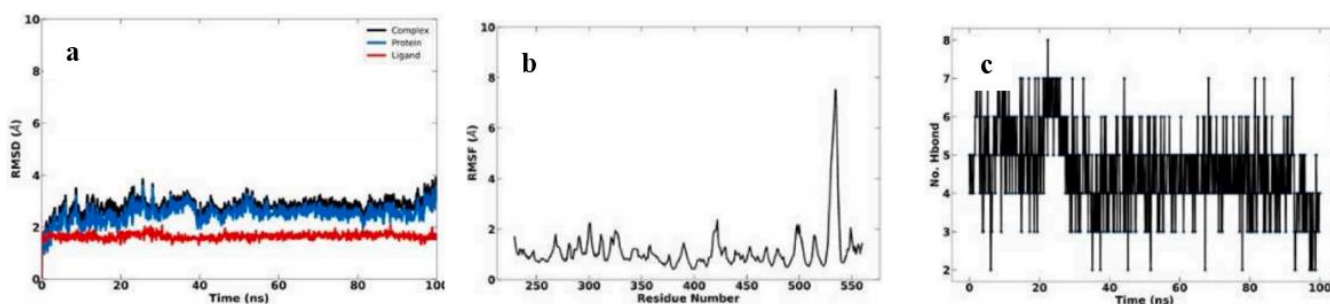
**Hình 4.5.** Động lực học của sự gắn ganosinensin B với sortase A trong thời gian mô phỏng 100 ns. (a) RMSD; (b) RMSF; (c) Khoảng cách trung tâm khối lượng trung bình giữa ligand và protein; (d) Liên kết hydrogen; (e) Bán kính quay của phức hợp; (f) Diện tích bề mặt có thể tiếp xúc dung môi. RMSD: Độ lệch trung bình bình phương; RMSF: Dao động trung bình bình phương.



**Hình 4.6.** Động lực học của sự gắn ganosinensin B với sortase A trong thời gian

mô phỏng 100 ns. (a) RMSD; (b) RMSF; (c) Khoảng cách trung tâm khối lượng trung bình giữa ligand và protein; (d) Liên kết hydrogen; (e) Bán kính quay của phức hợp; (f) Diện tích bề mặt có thể tiếp xúc với dung môi. RMSD: Độ lệch trung bình bình phương; RMSF: Dao động trung bình bình phương.

Trong các hợp chất có ái lực cao thông qua quá trình docking với ClfA, ganosinensin A cho thấy có ái lực cao nhất với ClfA có điểm số docking thấp nhất -10,4 kcal/mol. Do vậy, chúng tôi thực hiện phân tích ĐLHPT trên phức hợp ClfA-ganosinensin A để đánh giá tính ổn định ở các điều kiện nhiệt độ và áp suất mô phỏng như trong tế bào. Kết quả mô phỏng ĐLHPT của ClfA-ganosinensin A cho thấy phức hợp này vẫn ổn định trong suốt quá trình mô phỏng (Hình 4.7a) với RMSD dưới 2,5 Å. Phân tích tương tác giữa ganosinensin A và amino acid 0 đến 525 của ClfA từ với giá trị RMSF đều < 2,5 Å cho thấy sự liên kết ổn định giữa phức hợp ligand và protein. Tuy nhiên, vị trí liên kết amino acid 525 đến 550 có giá trị RMSF lớn hơn 2,5 Å cho thấy đây vị trí không ảnh hưởng tới sự tương tác giữa ganosinensin A và yếu tố kết tụ A. Điều này cũng được chứng minh bằng docking phân tử, mô hình 2D và 3D giữa ganosinensin A và yếu tố kết tụ A các liên kết và tương tác được tạo ra chủ yếu từ amino acid 250 đến 449. Điều này chứng minh rằng ganosinensin A tương tác trong vùng trung tâm hoạt động của ClfA.



**Hình 4.7.** Động lực học của liên kết ganosinensin A với ClfA trong thời gian mô phỏng 100 ns. (a) RMSD; (b) RMSF; (c) Liên kết hydrogen. RMSD: Độ lệch trung bình bình phương; RMSF: Dao động trung bình bình phương.

Kết quả tính toán tổng số liên kết hydrogen hình thành giữa ganosinoid A và ClfA trong 100 ns cho thấy ganosinoid A hầu như luôn hình thành 4-6 liên kết hydrogen với ClfA (Hình 4.7c), góp phần làm ổn định phức hợp này.

Các phân tích mô phỏng DLHPT xác nhận sự ổn định của phức hợp giữa SrtA với ganosinensin B và ganosinoid A, là hai terpenoid có điểm số docking phân tử tốt nhất trong 5 ligand có khả năng cao nhất để hình thành phức hợp với SrtA dựa vào phương pháp docking phân tử. Tương tự kết quả mô phỏng DLHPT xác nhận sự ổn định của phức hợp giữa ClfA với ganosinoid A là một trong hai hợp chất có điểm số docking phân tử tốt nhất bởi phương pháp docking phân tử.

### 4.2.3. Hoạt tính kháng *S. aureus* in vitro của cao chiết 70% ethanol quả thể các mẫu nấm

#### 4.2.3.1. Thu nhận cao chiết tổng ethanol 70%

Ethanol 70% là dung môi có khả năng thấm xuyên qua vách tế bào, tạo được nối hydrogen liên phân tử với các nhóm phân cực khác, nên được xem là dung môi vạn năng, giúp thu nhận được cả các hợp chất có độ phân cực mạnh, vừa và yếu, để chiết các hợp chất có trong bột quả thể. Hiệu suất thu hồi cao chiết từ bột quả thể 4 loài nấm (5 chủng) nghiên cứu được ghi nhận ở Bảng 4.6. Hiệu suất thu hồi cao chiết bằng ethanol 70% từ bột quả thể của 5 chủng nấm *G. multiplicatum* VNKKK1901, *Amauroderma subresinosum* VNKKK1904, *G. sinense* VNKKK1902, *G. lingzhi* VNKKK1905A2, *G. lingzhi* VNKKK1903, lần lượt là  $2,40 \pm 0,06\%$ ,  $3,56 \pm 0,21\%$ ,  $5,68 \pm 0,20\%$ ,  $5,79 \pm 0,16\%$ ,  $6,00 \pm 0,02\%$ .

**Bảng 4.6.** Hiệu suất thu hồi cao chiết bằng ethanol 70% từ bột quả thể các loài nấm nghiên cứu

Chủng nấm	Hiệu suất thu hồi cao chiết (%) <sup>*</sup>
<i>Amauroderma subresinosum</i> VNKKK1904	$3,56 \pm 0,21^a$
<i>Ganoderma multiplicatum</i> VNKKK1901	$2,40 \pm 0,06^a$
<i>Ganoderma sinense</i> VNKKK1902	$5,68 \pm 0,20^a$
<i>Ganoderma lingzhi</i> VNKKK1903	$6,00 \pm 0,02^a$
<i>Ganoderma lingzhi</i> VNKKK1905A2	$5,79 \pm 0,16^a$

\*Hiệu suất trung bình của 3 lần lặp lại  $\pm$  SD (standard deviation, độ lệch chuẩn), <sup>a</sup>với xử lý số liệu theo ANOVA một yếu tố với  $p < 0,05$ .

#### 4.2.3.2. Hoạt tính kháng *S. aureus* in vitro của cao chiết 70% ethanol quả thể

Kết quả đánh giá bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch được thể hiện tại Bảng 4.7. Khi tăng hàm lượng cao chiết thì đường kính vòng vô khuẩn tăng lên. Trong 5 loại cao chiết được khảo sát, 3 cao chiết từ *G. multiplicatum* VNKKK1901, *G. sinense* VNKKK1903 và *G. lingzhi* VNKKK1903 cho thấy có hoạt tính kháng *S. aureus* với mức độ kháng khác nhau. Đường kính vòng vô khuẩn từ cao chiết nấm *G. multiplicatum* VNKKK1901 lớn hơn cao chiết của 2 chủng còn lại ở tất cả các nồng độ từ 1 đến 4 mg/đĩa giấy. Cụ thể, tại hàm lượng 1 mg/đĩa giấy, cao chiết nấm *G. multiplicatum* VNKKK1901 có đường kính vòng vô khuẩn là  $8,33 \pm 0,49$  mm, tương đương với cao chiết *G. sinense* VNKKK1903 tại hàm lượng 2 mg/đĩa giấy ( $8,33 \pm 0,72$  mm) và lớn hơn cao chiết *G. lingzhi* VNKKK1903 tại hàm lượng 2 mg/đĩa giấy ( $7,33 \pm 0,27$  mm). Tại hàm lượng 2 mg/đĩa giấy cao chiết nấm *G. multiplicatum* VNKKK1901 có vòng vô khuẩn với đường kính  $10,33 \pm 0,27$  mm lớn hơn nhiều so với 2 cao chiết *G. sinense* VNKKK1903 và *G. lingzhi* VNKKK1903 ở cùng hàm lượng cao. Cao chiết của *A. subresinosum* VNKKK1904 và *G. lingzhi* VNKKK1905-A2 không tạo được vòng vô khuẩn ở các hàm lượng được khảo sát.

**Bảng 4.7.** Đường kính vòng vô khuẩn của cao chiết ethanol 70% của 5 chủng nấm (mm)

Lượng cao chiết/ đĩa giấy (mg)	Cao chiết				
	<i>G. multiplicatum</i>	<i>G. sinense</i>	<i>G. lingzhi</i> 1903*	<i>G. lingzhi</i> 1905A2**	<i>A. subresinosum</i>
1	8,33 ± 0,49	-	-	-	-
2	10,33 ± 0,27	8,33 ± 0,72	7,33 ± 0,33	-	-
3	11,00 ± 0,00	9,00 ± 0,00	7,67 ± 0,27	-	-
4	12,67 ± 0,49	9,33 ± 0,27	9,00 ± 0,47	-	-
(+) ciprofloxacin	31,00 ± 0,00	32,67 ± 0,54	30,33 ± 0,27	31,67 ± 0,67	32,00 ± 0,00
(-) DMSO	-	-	-	-	-

Kết quả được biểu thị: Trung bình ± độ lệch chuẩn; (-): Không có vòng kháng khuẩn; \*: *G. lingzhi* VNKKK1903; \*\*: *G. lingzhi* VNKKK1905A2.

Kết quả xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) đối với *S. aureus* ATCC 29213 của các mẫu nấm (Bảng 4.8) cũng cho thấy mức độ nhạy cảm khác nhau của chủng vi khuẩn này đối với cao chiết của các chủng nấm khác nhau. Trong đó vi khuẩn nhạy cảm nhất đối với cao chiết nấm *G. sinense* VNKKK1902 với nồng độ ức chế tối thiểu thấp nhất (1,875 mg/mL), tiếp đến là cao của các nấm *A. subresinosum* VNKKK1904 (3,125 mg/mL), *G. multiplicatum* VNKKK1901 (3,75 mg/mL), *G. lingzhi* VNKKK1905A2 (6,25 mg/mL), cao nhất là *G. lingzhi* VNKKK1903 (9,375 mg/mL).

**Bảng 4.8.** MIC, MBC, MBC/MIC đối với *S. aureus* ATCC 29213 của cao chiết nấm 70% ethanol được khảo sát \*, *G. lingzhi* VNKKK1903; \*\*, *G. lingzhi* VNKKK1905A2

	Cao chiết/kháng sinh (mg/mL)					
	<i>G. multi- plicatum</i>	<i>G. sinense</i>	<i>G. lingzhi</i> 1903*	<i>G. lingzhi</i> 1905A2**	<i>A. subre- sinosum</i>	Ciproflo- xacin
<b>MIC</b>	3,75	1,875	9,375	6,25	3,125	0,0125
<b>MBC</b>	7,5	3,75	18,75	25,0	12,50	0,05
<b>MBC/ MIC</b>	2	2	2	4	4	4

Cao chiết có MBC thấp nhất là *G. sinense* VNKKK1902 (3,75 mg/mL) cho thấy khả năng diệt *S. aureus* ATCC 29213 mạnh nhất, tiếp đó là cao chiết nấm *G. multiplicatum* VNKKK1901 với MBC là 7,5 mg/mL, cao chiết của *A. subresinosum* VNKKK1904 với MBC 12,50 mg/mL, *G. lingzhi* VNKKK1903 với MBC thấp hơn *G. lingzhi* VNKKK1905A2 với MBC 25,0 mg/mL. So với cao chiết nấm *G. lingzhi* VNKKK1905A2, cao chiết nấm *G. lingzhi* VNKKK1903 có MIC cao hơn (9,375 mg/mL so với 6,25 mg/mL) nhưng lại có chỉ số MBC thấp hơn (18,75 mg/mL so với 25,0 mg/mL). MIC và MBC của ciprofloxacin tuần tự là 0,0125 mg/mL và 0,05 mg/mL. Đối chứng âm là DMSO 5% cũng là dung môi hòa tan các cao chiết không có sự ảnh hưởng tới sự tăng trưởng vi khuẩn *S. aureus* ATCC 29213 thông qua không xuất hiện vòng kháng khuẩn.

Tổng hợp các kết quả nêu trên cho phép nhận định rằng trong số 5 chủng nấm khảo sát, cao chiết nấm *G. multiplicatum* VNKKK1901 và nấm *G. sinense* VNKKK1902 có hoạt tính kháng *S. aureus in vitro* tốt nhất. Trong giới hạn của luận án này, NCS chọn nấm *G. multiplicatum* VNKKK1901, là mẫu nấm có số lượng quả thể đủ số lượng, làm đối tượng cho các nghiên cứu sâu hơn về các hợp chất có hoạt tính kháng *S. aureus* và cơ chế kháng của chúng.

#### 4.2.4. Thành phần các nhóm hợp chất hữu cơ trong cao chiết 70% ethanol và trong các cao phân đoạn

##### 4.2.4.1. Thành phần các nhóm hợp chất hữu cơ trong cao chiết 70% ethanol

Kết quả định tính các hợp chất hữu cơ trong cao chiết ethanol 70% quả thể nấm *G. multiplicatum* thu nhận tại VQG Kon Ka Kinh năm 2019 cho thấy trong cao chiết có các hợp chất alkaloid, đường khử, steroid, tanin và hợp chất phenol, triterpenoid, saponin, flavonoid, terpenoid. Hàm lượng hợp chất phenol, triterpenoid và polysaccharide tổng số (Bảng 4.10) trong cao chiết nấm *G. multiplicatum* VNKKK1901 lần lượt là  $56,1 \pm 1,1$ ;  $90,9 \pm 2,2$ ;  $46,9 \pm 1,1$  mg/g.

**Bảng 4.9.** Hàm lượng hợp chất phenol, triterpenoid và polysaccharide tổng số trong cao GMT

Mẫu	Hợp chất phenol	Triterpenoid	Polysaccharide
Hàm lượng (mg/g)*	$56,1 \pm 1,1^a$	$90,9 \pm 2,2^a$	$46,9 \pm 1,1^b$

\*Kết quả được biểu thị hiệu suất trung bình của 3 lần lặp lại  $\pm$  SD (standard deviation, độ lệch chuẩn, với xử lý số liệu theo ANOVA một yếu tố với  $p < 0,05$ , với hậu kiểm theo Tukey post hoc (<sup>a</sup>Có sự khác biệt thống kê ( $p < 0,0001$ ), <sup>b</sup>Có sự khác biệt thống kê ( $p < 0,001$ ). GMT: cao chiết ethanol 70% quả thể nấm *G. multiplicatum*.

Để tiếp tục cô lập hợp chất hữu cơ có trong cao chiết ethanol 70% chúng tôi tiếp tục phân đoạn cao tổng nấm *G. multiplicatum* VNKKK1901.

##### 4.2.4.2. Thu nhận các phân đoạn từ cao chiết 70% ethanol

Kết quả thu nhận cao phân đoạn từ cao GMT là cao tổng ethanol quả thể nấm *G. multiplicatum* VNKKK1901 (Bảng 4.10) cho thấy hiệu suất thu được của ba dung môi hữu cơ là khác nhau và theo thứ tự như sau cao GMH với dung môi *n*-hexane ( $32,7 \pm 2,4\%$ ) tương đương với cao GME với dung môi ethyl acetate ( $32,1 \pm 2,0\%$ ) > cao GMN với dung môi nước ( $23,8 \pm 1,1\%$ ). Điều này cho thấy quả thể của *G. multiplicatum* VNKKK1901 chứa nhiều hợp chất không phân cực, nhiều hợp chất có độ phân cực trung bình, và ít nhất là các hợp chất phân cực. Điều này chứng minh rằng hợp chất trong nấm *G. multiplicatum* trong nghiên cứu này có thành phần các hợp chất tương tự như các nghiên cứu trên một số loài *Ganoderma* khác đặc biệt là *G. lucidum* trong quả thể nấm chủ yếu là các hợp chất có độ phân cực yếu đến trung bình đa số thuộc lớp lipid và hợp chất phenol [153].

**Bảng 4.10.** Hiệu suất phân tách cao chiết từ 10 g cao GMT

Mẫu	GMH	GME	GMN
Hiệu suất* (%)	$32,7 \pm 2,9^{***}$	$32,1 \pm 2,5^{**}$	$23,8 \pm 1,4^*$

\* Kết quả trung bình của 3 lần lặp lại  $\pm$  độ lệch chuẩn, với xử lý số liệu theo ANOVA một yếu tố với  $p < 0,05$ , với hậu kiểm theo Tukey post hoc. \*\*Có sự khác biệt thống kê so với phân đoạn cao nước ( $p < 0,05$ ). \*\*\*Có sự khác biệt thống kê so với phân đoạn cao nước ( $p < 0,01$ ). GMT: cao chiết ethanol 70% quả thể nấm *G. multiplicatum*, GMH: phân đoạn cao *n*-hexane, GME: phân đoạn cao ethyl acetate, GMN: phân đoạn cao nước

##### 4.2.4.3. Hàm lượng các nhóm hợp chất phenol, triterpenoid và polysaccharide

Hàm lượng các nhóm hợp chất phenol, triterpenoid, polysaccharide tổng số trong cao phân đoạn từ cao GMT được trình bày tại Bảng 4.11.

**Bảng 4.11.** Hàm lượng hợp chất phenol, triterpenoid và polysaccharide tổng số trong các mẫu cao phân đoạn

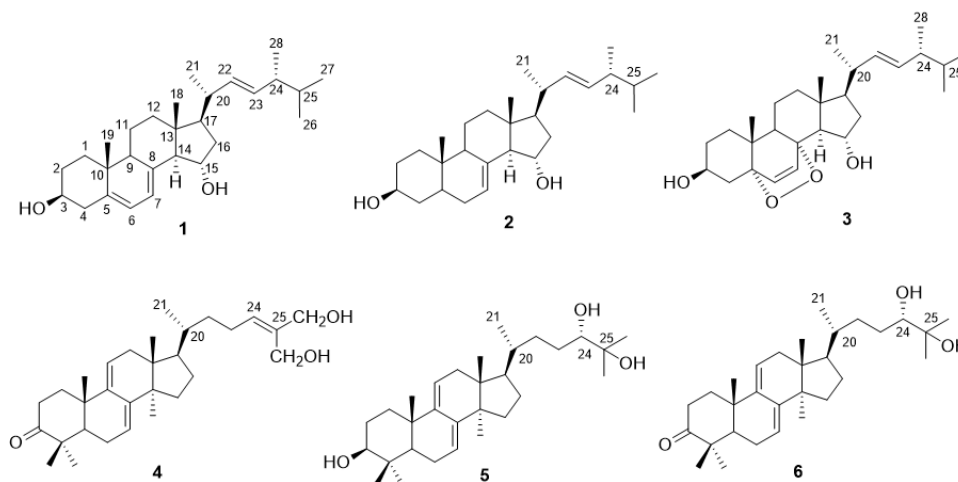
Nhóm hợp chất (mg/g)*	GMH	GME	GMN
Hợp chất phenol	$58,8 \pm 1,3^a$	$95,6 \pm 0,7^a$	$71,2 \pm 0,6^a$
Triterpenoid	$84,5 \pm 2,0^a$	$139,7 \pm 0,8^a$	$59,1 \pm 4,0^a$
Polysaccharide	$30,2 \pm 3,6^b$	$54,0 \pm 3,6^a$	$101,9 \pm 5,4^a$

\* Kết quả trung bình của 3 lần lặp lại  $\pm$  độ lệch chuẩn, với xử lý số liệu theo ANOVA một yếu tố với  $p < 0,05$ , với hậu kiểm theo Tukey post hoc (<sup>a</sup>Có sự khác biệt thống kê ( $p < 0,0001$ ), <sup>a</sup>Có sự khác biệt thống kê ( $p < 0,001$ ). GMH: phân đoạn cao *n*-hexane, GME: phân đoạn cao ethyl acetate, GMN: phân đoạn cao nước

Hàm lượng hợp chất phenol tổng số của phân đoạn cao GME là cao nhất trong 3 phân đoạn cao ( $95,6 \pm 0,7$  mg/g), tiếp đó là phân đoạn cao GMN ( $71,2 \pm 0,6$  mg/g) trong khi đó thấp nhất là phân đoạn cao GMH ( $58,8 \pm 1,3$  mg/g). Hợp chất phenol là nhóm hợp chất trong cấu trúc có vòng benzen mang một hoặc nhiều nhóm chức hydroxyl – OH. Do vậy, các hợp chất phenol thường tan trong nước hoặc các dung môi có độ phân cực từ trung bình đến cao. Trong nghiên cứu này, hợp chất phenol được thu nhận nhiều nhất ở phân đoạn GME sử dụng ethyl acetate làm dung môi, tiếp đến là phân đoạn cao GMN sử dụng nước làm dung môi. Kết quả ở Bảng 4.11 cho thấy lượng triterpenoid của nấm *G. multiplicatum* chủ yếu thu được ở phân đoạn GME ( $139,7 \pm 0,8$  mg/g) và GMH ( $84,5 \pm 2,0$  mg/g); thấp nhất là phân đoạn cao GMN ( $59,1 \pm 4,0$  mg/g). Kết quả thu nhận lượng triterpenoid cao nhất ở phân đoạn GME cho thấy các hợp chất triterpenoid thu được có độ phân cực trung bình đến yếu. Hàm lượng polysaccharide tăng theo độ phân cực của dung môi do các phân tử đường mang nhiều nhóm phân cực OH, cụ thể là cao nhất trong phân đoạn GMN ( $101,9 \pm 5,4$  mg/g), tiếp đó là phân đoạn GME ( $54,0 \pm 3,6$  mg/g), thấp nhất là phân đoạn GMH ( $30,2 \pm 3,6$  mg/g).

#### 4.2.5. Cô lập hợp chất từ phân đoạn cao GME của quả thể nấm *G. multiplicatum*

Cấu trúc và tên của 6 hợp chất COM1 - COM6 được phân lập từ phân đoạn cao EtOAc của quả thể nấm *G. multiplicatum* VNKKK1901 được xác định theo Hình 4.8.



**Hình 4.8.** Cấu trúc 6 hợp chất được phân lập từ phân đoạn cao GME của quả thể nấm *G. multiplicatum* VNKKK1901. 1, COM1 (ergosterol); 2, COM2 (stellasterol); 3, COM3 (ergosterol peroxide); 4, COM4 (ganoderiol F); 5, COM5 (lucidumol B); 6, COM6 (ganodermanondiol).

Như vậy, đây là công trình khoa học lần đầu tiên trên thế giới đã phân lập được từ quả thể nấm *G. multiplicatum* ba hợp chất thuộc nhóm steroid là ergosterol, ergosterol peroxide, stellasterol và ba hợp chất thuộc nhóm triterpenoid là ganoderiol F, ganodermanondiol và lucidumol B, là sáu hợp chất đã được phân lập từ các loài nấm khác thuộc chi *Ganoderma*, *Amauroderma* và *Haddowia* thuộc họ Ganodermataceae.

#### 4.2.6. Hợp chất có hoạt tính kháng *S. aureus* ở *G. multiplicatum* và giả thuyết về cơ chế kháng

Kết quả sàng lọc *in silico* (Bảng 4.12) cho thấy trong số 6 hợp chất được cô lập từ phân đoạn cao GME, ergosterol peroxide có ái lực gắn cao với yếu tố kết tụ A, ergosterol peroxide và ergosterol có ái lực gắn cao với dihydrofolate reductase. Ganoderiol F và lucidumol B tuy không nằm trong nhóm có ái lực cao với các protein nhưng kết quả điểm số docking với protein sortase A, yếu tố kết tụ A, phosphotransacetylase đều cao hơn điểm số docking của đối chứng ciprofloxacin. Ganodermanondiol có điểm số docking tốt hơn đối chứng ciprofloxacin đối với protein sortase A và yếu tố kết tụ A. Mười hợp chất thuộc nhóm tripterpenoid (7- oxoganoderic acid Z, ganosinoside A, ganosinensin B, ganoderic acid AM1, ganoderic acid D, ganoderic acid J, ganolucidic acid B, ganoderenic acid D, ganodermanontriol), 1 hợp chất steroid (24*R*-ergosta-7,2*E*-diene-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol) và 2 hợp chất phenol (1-methoxy-2-(2-methoxyethenyl)-benzene, jacareubin) được dự đoán *in silico* có ái lực cao với 4 protein mục tiêu (SrtA, ClfA, DHFR, Pta) không được chúng tôi phân lập từ phân đoạn cao GME.

**Bảng 4.12.** Điểm số docking với 4 protein liên quan đến tính kháng *S. aureus* của các hợp chất cô lập từ *G. multiplicatum* tốt hơn so với kháng sinh ciprofloxacin

Hợp chất	Điểm số docking (kcal/mol)			
	SrtA	ClfA	DHFR	Pta
Ciprofloxacin	- 6,7	-8,1	- 9,5	-7,1
Ergosterol	-7,9	- 9,3	- 10,2	- 7,7
Ergosterol peroxide	-7,6	- 10,2	- 10,2	- 7,6
Ganoderiol F	-7,8	- 9,1	NA	- 7,4
Ganodermanondiol	-7,8	- 9,7	NA	NA
Lucidumol B	-7,6	- 9,5	NA	- 8,0

NA: Điểm số docking nhỏ hơn kháng sinh ciprofloxacin

Ngoài cơ chế kháng dựa trên 2 hợp chất ergosterol peroxide, ergosterol và hai protein mục tiêu là ClfA và DHFR nêu trên, tính kháng *S. aureus* của cao chiết quả thể nấm *G. multiplicatum* có thể còn dựa trên sự gắn của ganoderiol F, ganodermanondiol và lucidumol B làm bất hoạt SrtA, ClfA, và sự gắn của ganoderiol F và lucidumol B làm bất hoạt Pta. Ngoài ra, tính kháng *S. aureus* có thể còn dựa trên các hợp chất khác được dự đoán có ái lực gắn cao với ClfA, DHFR, cũng như SrtA, Pta mà chúng tôi chưa phân lập được trong luận án này.

### 4.3. Nghiên cứu đặc điểm thành phần, cấu tạo và hoạt tính kháng oxy hóa của thể sợi nấm linh chi

#### *Amauroderma subresinosum*

##### 4.3.1. Thu nhận các phân đoạn giàu polysaccharide từ thể sợi nấm

Bảy phân đoạn giàu polysaccharide (ký hiệu ASF1, ASF2, ASF3, ASF4, ASF5, ASF6, ASF7) từ thể sợi nấm được thu nhận. Hiệu suất thu nhận các phân đoạn từ ASF-1 đến ASF-7 từ 20 g hệ sợi nấm khô sau khi loại chất béo và các phân tử nhỏ bằng ethanol được thể hiện ở Bảng 4.13. Phân đoạn thu nhận từ nước nóng ASF-1 có hiệu suất thu nhận cao nhất  $6,16 \pm 1,01\%$  (w/w) sau khi rửa với dung môi hữu cơ. Phân đoạn ASF-2, ASF-3 thu nhận từ phần bột rắn sau khi chiết bằng nước nóng, được tiếp tục chiết bằng NaOH 2%, lọc, ly tâm tách thành tủa (ASF-2) và dịch nổi (ASF-3). Hiệu suất thu nhận của hai phân đoạn này lần lượt là  $0,18 \pm 0,02\%$  và  $16,46 \pm 0,26\%$ . Phần không tan còn lại sau khi chiết bằng NaOH 2% được tiếp tục chiết bằng NaOH 2% nóng để phá vách tế bào nấm, ly tâm thành dịch nổi (ASF4) và tủa. Hiệu suất thu nhận phân đoạn ASF-4 là  $0,40 \pm 0,04\%$ . Phần tủa được tiếp tục chiết với acetone 15%, ly tâm thành tủa ASF7 và dịch nổi. Hiệu suất thu nhận ASF7 là  $12,60 \pm 1,48\%$ . Phần dịch nổi để thu nhận polysaccharide từ thành tế bào bằng cách kiềm hóa đến 10,0, ly tâm thu được tủa (ASF-5) và dịch nổi. Polysaccharide trong dịch nổi được tủa bằng ethanol tuyệt đối (ASF-6). Hiệu suất thu nhận ASF-5, ASF-6 lần lượt là  $0,05 \pm 0,02\%$  và  $0,48 \pm 0,08\%$ .

**Bảng 4.13.** Hiệu suất thu nhận các phân đoạn giàu polysaccharide từ hệ sợi nấm *A. subresinosum*

Phân đoạn	Dung môi chiết, phân đoạn sau ly tâm	Hiệu suất (% w/w)	Thành phần
ASF-1	Nước nóng	6,16 ± 1,01*	Polysaccharide, proteins
ASF-2	Tủa của NaOH 2%	0,18 ± 0,02*	Polysaccharides
ASF-3	Dịch nổi của NaOH 2%	16,46 ± 0,26**	Polysaccharides
ASF-4	NaOH 2% nóng	0,40 ± 0,04*	Polysaccharides
ASF-5	Tủa acetone 15%	0,05 ± 0,02*	Polysaccharides
ASF-6	Dịch nổi 15% acetone	0,48 ± 0,08*	Polysaccharides
ASF-7	Tủa còn lại	12,60 ± 1,48**	Polysaccharides
<b>Tổng số</b>		36,35 ± 1,34	Polysaccharides, proteins

Kết quả trung bình của 3 lần lặp lại ± độ lệch chuẩn, với xử lý số liệu theo ANOVA một yếu tố với  $p < 0,05$ , với hậu kiểm theo Tukey post doc. \*Có sự khác biệt thống kê ( $p < 0,05$ ). \*\*Có sự khác biệt thống kê so với phân đoạn cao nước ( $p < 0,01$ ).

Tổng hiệu suất thu nhận của tất cả các phân đoạn sau quá trình tách chiết là  $39,35 \pm 1,34\%$  (w/w), tương ứng với hơn một phần ba khối lượng sợi nấm khô ban đầu. Trong đó polysaccharide của *A. subresinosum* được thu nhận ở phân đoạn kiềm và nước nóng trong nghiên cứu này là cao hơn so với các phân đoạn từ các loài nấm được nghiên cứu trước đây. Ở các phân đoạn chiết tách khác, kết quả ở Bảng 4.12 cho thấy hiệu suất thu nhận polysaccharide các phân đoạn chiết bằng dung dịch NaOH 2% tại nhiệt độ phòng là cao nhất, trong khi đó, hiệu suất thu nhận polysaccharide các phân đoạn chiết bằng dung môi acetone 15% là thấp nhất. Trong 7 phân đoạn giàu polysaccharide, hiệu suất thu nhận các phân đoạn ASF-1, ASF-3 và ASF-7 là cao nhất. Do vậy, chúng tôi sử dụng ba phân đoạn này để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

#### 4.3.2. Đặc điểm thành phần các phân đoạn giàu polysaccharide ASF-1, ASF-3 và ASF-7

##### 4.3.2.1. Trọng lượng phân tử trung bình của polysaccharide

Trọng lượng phân tử trung bình của ba phân đoạn (ASF-1, ASF-3 và ASF-7) được thể hiện trong Bảng 4.14. Phân đoạn ASF-1 có trọng lượng phân tử trung bình là 22,53 kDa tương đồng với polysaccharide được chiết xuất bằng nước nóng của các loài nấm thuộc chi *Ganoderma* ( $10^3$ - $10^4$  Da). Trong nghiên cứu này ASF-1 là phân đoạn thu nhận từ *A. subresinosum*, một loài thuộc họ Ganodermateace, có thể cũng sẽ có những đặc điểm tương tự về trọng lượng và hoạt tính sinh học giống như các loài cùng họ. Phân đoạn ASF-3 thu nhận từ chiết xuất bằng dung môi kiềm có trọng lượng phân tử trung bình là 750 Da. Phân đoạn ASF-7 là phân đoạn không tan trong các dung môi nước nóng, kiềm, acetone, có trọng lượng phân tử trung bình 35,73 kDa. Trọng lượng phân tử của ASF-7 cao hơn 2 phân đoạn còn lại vì đây là phân đoạn cặn còn lại của quá trình chiết qua các dung môi khác nhau, nên chứa nhiều polysaccharide có trọng lượng phân tử lớn so với các phân đoạn còn lại.

**Bảng 4.14.** Trọng lượng phân tử trung bình của các phân đoạn giàu polysaccharide từ hệ sợi nấm *A. subresinosum*

Phân đoạn	ASF-1	ASF-3	ASF-7
Mw <sup>a)</sup> (kDa)	22,53	0,75	35,73

<sup>a</sup>Mw: Trọng lượng phân tử trung bình

##### 4.3.2.2. Thành phần đường đơn

Thành phần monosaccharide của các phân đoạn ASF-1, ASF-3 và ASF-7 thu được từ sợi nấm *A. subresinosum* được thể hiện ở Bảng 4.15. Trong số các monosaccharide, loại đường đơn được chính được phát hiện trong tất cả các phân đoạn là glucose. Điều này phù hợp với các nghiên cứu trước đây về polysaccharide của nấm linh chi, trong đó glucose là thành phần chính [200]. Mặt khác, môi trường nuôi cấy PDB được sử dụng trong nghiên cứu này chủ yếu



chứa glucose và thành tế bào nấm chứa các cấu trúc giàu glucose. Hàm lượng glucose vượt hơn 70% ở phần hòa tan trong nước và đạt gần 88% ở phân đoạn ASF-7. Trong nghiên cứu này, rhamnose không được phát hiện trong polysaccharide của cả ba phân đoạn.

**Bảng 4.15.** Thành phần (% w/w) các monosaccharide trong các phân đoạn polysaccharide ASF-1, ASF-3 và ASF-7 của hệ sợi nấm *A. subresinosum*

Phân đoạn	Tỷ lệ khối lượng (% w/w)					
	Ara	Gal	Glc	Man	Rha	Xyl
ASF-1	1,30	1,00	70,24	16,73	ND	10,73
ASF-3	ND	8,61	84,11	ND	ND	7,28
ASF-7	0,24	1,22	87,78	6,04	ND	4,72

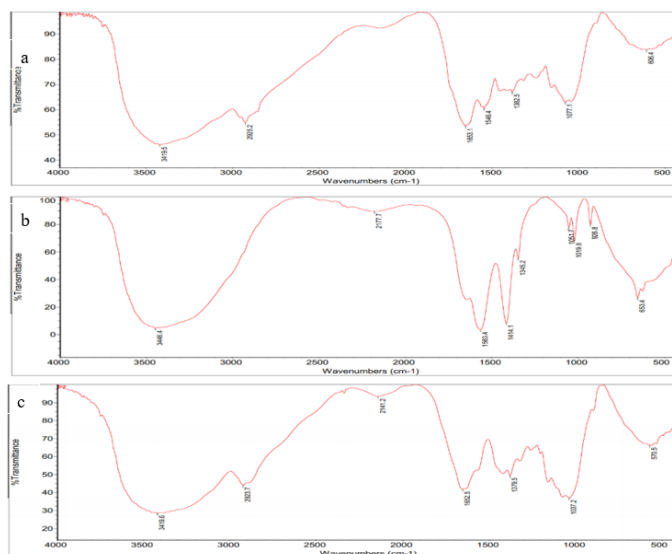
Ara: arabinose; Gal: galactose; Glc: glucose; Man: mannose; Rha: rhamnose; Xyl: xylose; ND: Không phát hiện.

Các kết quả trên đây cho thấy thành phần monosaccharide của các phân đoạn *A. subresinosum* chủ yếu được đặc trưng bởi glucose. Có thể nguồn carbon chính của môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng đến cấu trúc đường đơn của vách tế bào ở loài này. Mannose và xylose được tìm thấy với tỷ lệ cao hơn trong ASF-1, cho thấy sự hiện diện của chúng trong cấu trúc lớp ngoài cùng của vách tế bào, trong khi arabinose và galactose được phát hiện với tỷ lệ khối lượng tương đương nhau. Mặt khác rhamnose không được phát hiện không ba phân đoạn được phân tích.

#### 4.3.2.3. Phân tích đặc điểm của polysaccharide bằng phổ FTIR

Phổ FTIR của ba phân đoạn ASF-1, ASF-3 và ASF-7 được thể hiện ở Hình 4.8. Cả ba phân đoạn đều có các peak mạnh trong hoảng 900 đến 1.300  $\text{cm}^{-1}$  biểu thị các liên kết C-C và C-O trong vòng pyranose, đồng thời xác nhận sự hiện diện của polysaccharide trong các phân đoạn này.

**Hình 4.8.** Quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier của các phân đoạn giàu polysaccharide thu nhận từ hệ sợi nấm *A. subresinosum*. a: ASF-1; b: ASF-3; c: ASF-7. Kết quả phân tích trên phổ hồng ngoại (trong khoảng 4.000  $\text{cm}^{-1}$  đến 400  $\text{cm}^{-1}$ ) và % độ truyền qua (tỷ lệ hấp thụ ánh sáng hồng ngoại)



Ở ba phân đoạn giàu polysaccharide từ *A. subresinosum*, các nhóm hydroxyl được phát hiện ở 3.418,5  $\text{cm}^{-1}$  trong phổ FTIR của phân đoạn ASF-1, 3.446,4  $\text{cm}^{-1}$  đối với ASF-3 và 3.419,6  $\text{cm}^{-1}$  trong trường hợp ASF-7. Các kết quả này tương đồng với các nghiên cứu trước đây về polysaccharide của một số loài trong họ nấm Ganodermataceae cho thấy peak kéo dài rộng điển hình trong khoảng 3.400  $\text{cm}^{-1}$  là của nhóm hydroxyl. Bên cạnh đó, các peak tại 2.923,7 và 2.925,2  $\text{cm}^{-1}$  biểu thị nhóm C-H và các peak 1.653,1 và 1.345,1  $\text{cm}^{-1}$  biểu thị nhóm carboxyl. Các peak 1.077,1, 1.051,7 và 1.037,2  $\text{cm}^{-1}$  trong phổ FTIR lần lượt của ASF-1, ASF-3 và ASF-7 cho thấy sự hiện diện của vòng pyranose. Ngoài ra, một peak yếu tại 926,8  $\text{cm}^{-1}$  liên quan tới sự có mặt của cấu hình  $\beta$  của liên kết glycoside, cho thấy rằng monosaccharide của ASF-3 chủ yếu là glucose.

#### 4.3.3. Hoạt tính kháng oxy hóa của các phân đoạn ASF-1, ASF-3 và ASF-7

Hoạt tính kháng oxy hóa được xác định thông qua mức độ loại bỏ gốc tự do DPPH của 3 phân đoạn ASF-1, ASF-3 và ASF-7 được trình bày tại Bảng 4.16 và đường biểu diễn được trình bày tại Phụ lục 5, trong đó giá trị IC<sub>50</sub> của ba phân đoạn ASF-1, ASF-3 và ASF-7 lần lượt là 12,9 ± 1,5, 12,8 ± 2,0 và 16,1 ± 1,8 µg/mL. Trong ba phân đoạn được khảo sát ASF-3 có IC<sub>50</sub> thấp nhất từ đó cho thấy rằng phân đoạn ASF-3 có hoạt tính kháng oxy hóa mạnh nhất trong loại bỏ gốc tự do DPPH. Khả năng kháng oxy hóa của ba phân đoạn ASF-1, ASF-3 và ASF-7 được xác định bằng thử nghiệm với ABTS<sup>+</sup> được trình bày tại Bảng 4.16 và đường biểu diễn được trình bày tại Phụ lục 16. ASF-1 có giá trị IC<sub>50</sub> là 10,7 ± 1,0 µg/mL, ASF-7 là 12,6 ± 1,8 µg/mL, thấp nhất là ASF-3 là 8,5 ± 1,0 µg/mL. Ascorbic acid (đối chứng dương) có IC<sub>50</sub> trong thử nghiệm DPPH và ABTS<sup>+</sup> lần lượt là 4,1 ± 0,6 và 3,2 ± 0,4 µg/mL.

**Bảng 4.16.** Hoạt tính kháng oxy hóa của các phân đoạn giàu polysaccharide từ hệ sợi nấm *A. subresinosum* (IC<sub>50</sub>) µg/mL

Phân đoạn	Hoạt tính kháng oxy hóa (IC <sub>50</sub> , µg/mL)	
	DPPH	ABTS
ASF-1	12,9 ± 1,5	10,7 ± 1,0
ASF-3	12,8 ± 2,0*	8,5 ± 1,0**
ASF-7	16,1 ± 1,8	12,6 ± 1,8
Ascorbic acid	4,1 ± 0,6	3,2 ± 0,4

Kết quả thể hiện giá trị trung bình 3 lần lặp lại ± độ lệch chuẩn xử lý số liệu theo ANOVA một yếu tố và hậu kiểm theo Tukey post doc; \*  $p < 0,01$ ; \*\*  $p < 0,05$ ; DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; ABTS: 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)

## CHƯƠNG 5. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### 5.1. Kết luận

#### 5.1.1. Phân loại học các mẫu nấm thu nhận tại Tây Nguyên và TP. Hồ Chí Minh

Kết hợp giữa đặc điểm hình thái và mối quan hệ tiến hoá dựa trên trình tự nucleotide của vùng ITS đã định danh được 13 loài thuộc chi *Ganoderma*, 1 loài thuộc chi *Amauroderma*, 1 loài thuộc chi *Sanguinoderma*, 1 loài thuộc chi *Foraminispora* từ các mẫu nấm Ganodermataceae thu nhận tại VQG Kon Ka Kinh, Bidoup Núi Bà, Chu Yang Sin, Khu BTTN Ea sô, trên địa bàn Tây Nguyên và tại TP. Hồ Chí Minh với các ghi nhận đáng chú ý như sau: 6 loài lần đầu tiên được ghi nhận tại Việt Nam cho đến tháng 9 năm 2024 là *F. austrosisensis*, *G. casuarinicola*, *G. ellipsoideum*, *G. quangxiense*, *G. subangustisporum* và *S. rugosum*; đặc biệt chi *Foraminispora* và *Sanguinoderma* lần đầu tiên được ghi nhận tại Việt Nam dựa trên hình thái học và sinh học phân tử. Ngoài ra, lần đầu tiên trên thế giới, luận án đã ghi nhận được sự ký sinh, gây chết của loài *G. multipileum* trên cây Phượng vĩ *Delonix regia*.

#### 5.1.2. Khảo sát hoạt tính kháng *S. aureus* của cao chiết nấm

Từ cao chiết 70% EtOAc của quả thể của chủng *G. multiplicatum* VNKKK1901 có hoạt tính kháng *S. aureus* *in vitro* đã cô lập được 6 hợp chất là ergosterol, ergosterol peroxide, ganoderiol F, ganodermanondiol, lucidumol B và stellasterol; trong số này, phương pháp docking phân tử và động lực học phân tử cho thấy ergosterol peroxide có ái lực gắn cao với yếu tố kết tụ A, trong khi đó, ergosterol và ergosterol peroxide có ái lực cao với dihydrofolate reductase; do vậy có thể kết luận cơ chế kháng *S. aureus* của cao chiết quả thể nấm *G. multiplicatum* ít nhất là do sự ức chế chức năng, hoạt tính của hai protein này bởi ergosterol và ergosterol peroxide;

#### 5.1.3. Đặc điểm thành phần, cấu tạo và hoạt tính kháng oxy hóa của thể sợi nấm linh chi *Amauroderma subresinosum*

Đã thu nhận, xác định trọng lượng phân tử trung bình, thành phần, cấu trúc đường của 7 phân đoạn giàu polysaccharide từ thể sợi nấm chủng *A. subresinosum* VNKKK1904 và cho thấy phân đoạn ASF-3 từ dung môi kiềm

chứa các polysaccharide với các đặc điểm trọng lượng phân tử trung bình là 750 Da, thành phần đường chủ yếu  $\beta$ -glucan của pyranose, có khả năng chống oxy hóa cao nhất là  $12,8 \pm 2,0 \mu\text{g/mL}$  bằng phương pháp DPPH là  $8,5 \pm 1,0$ ,  $12,8 \pm 2,0 \mu\text{g/mL}$  bằng phương pháp ABTS.

## 5.2. Kiến nghị

Tiềm năng nghiên cứu của họ Ganodermataceae là rất lớn. Bên cạnh những kết quả đạt được, luận án vẫn còn một số vấn đề chưa giải quyết được. Do vậy, các vấn đề bổ sung nghiên cứu như sau:

- Tiến hành thí nghiệm đánh giá *in vitro* cao chiết và hợp chất lên chủng vi khuẩn tụ cầu vàng *Staphylococcus aureus* đa kháng thuốc.

- Nghiên cứu về các hoạt tính sinh học khác của các mẫu nấm thuộc họ Ganodermataceae. Từ đó, đánh giá được tiềm năng hoạt tính sinh học của họ nấm này làm cơ sở cho khai thác và bảo tồn nguồn gen họ nấm này có nguồn gốc từ Việt Nam.

- Tiếp tục các nghiên cứu về nuôi trồng khảo nghiệm quy mô lớn các loài nấm thu nhận được và đánh giá hàm lượng dược chất so sánh với mẫu thu nhận từ tự nhiên. Từ đó, khai thác được nguồn gen họ nấm Ganodermataceae tại Việt Nam mang lại giá trị kinh tế cao hơn.

## DANH MỤC CÁC BÀI BÁO/CÔNG TRÌNH KHOA HỌC

- [1] Nguyễn Thị Thu Trang, Trần Mạnh Hùng, Trần Linh Thuộc (2021). Nuôi trồng và bước đầu khảo sát khả năng kháng khuẩn của nấm linh chi (*Ganoderma multipileum*) phân lập tại Việt Nam. Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, 843.
- [2] Trang Thi Thu Nguyen, Nhung Thi Trang Le, Tan Khanh Nguyen, Huynh Van Thi Nguyen, Hoang Duc Nguyen, Linh Thuoc Tran, Kim Thuong Pham Van, Manh Hung Tran (2022). Morphology and Phylogeny of Five new Ganodermataceae (Polyporales) Species for Vietnam, *Research Aspects in Biological Science*, 4, 17-47. <https://doi.org/10.9734/bpi/rabs/v4/2955B>
- [3] Trang Thi Thu Nguyen, Trinh Thi Tuyet Nguyen, Tan Khanh Nguyen, Hoang Duc Nguyen, Linh Thuoc Tran, Vinh Phu Tran Pham and Manh Hung Tran (2023). Integrating in Silico and In Vitro studies to screen Anti-*Staphylococcus aureus* activity from Vietnamese *Ganoderma multiplicatum* and *Ganoderma sinense*, *Natural Product Communications*, 18(4), 1934578X231167289. <https://doi.org/10.1177/1934578X23116728>; **IF (2023)=1.5, WoS (SCIE), Q3.**
- [4] Trang T.T. Nguyen, Ngoc A.T. Pham, Quoc T. Tran, Huy D. Nguyen, Duc H. Nguyen, Khanh H.T. Pham, Manh H. Tran\*, Linh T. Tran\* (2023). Antioxidant Activities of Enriched Polysaccharide Fractions from Mycelia of *Amauroderma subresinosum*, *Trop J Nat Prod Res.*, 7(7), 3445-3451. <http://www.doi.org/10.26538/tjnpr/v7i7.24>  
**CiteScore (2023) = 1.1, Scopus**
- [5] Trang Thi Thu Nguyen, Hoang Duc Nguyen, Anh Tu Bui, Khanh Huyen Thi Pham, Kim Thuong Pham Van, Linh Thuoc Tran\*, Manh Hung Tran\* (2023). Phylogenetic Analysis and Morphology of *Ganoderma multipileum*, a *Ganoderma* Species Associated with Dieback of the Metropolitan Woody Plant *Delonix regia* (Boj. ex Hook.) Raf. in Vietnam, *Science Progress*, 106(3), 1-18. <https://doi.org/10.1177/00368504231195503>; **IF(2023)=2.6, WoS (SCIE), Q1.**
- [6] Trang Thi Thu Nguyen, Trinh Thi Tuyet Nguyen, Hoang Duc Nguyen, Tan Khanh Nguyen, Phu Tran Vinh Pham, Linh Thuy Thi Tran, Hong Khuyen Thi Pham, Phu Chi Hieu Truong, Linh Thuoc Tran\*, Manh Hung Tran\* (2024). Anti-*Staphylococcus aureus* potential of compounds from *Ganoderma* sp.: A comprehensive molecular docking and simulation approaches, *Heliyon*, 10(7), E28118. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e28118>; **IF(2023) =3.4, WoS (SCIE), Q1.**